

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de biología.



Función del motor molecular miosina no muscular II-B en la regulación
mecánica de la activación de los linfocitos T y la sinapsis inmune.

Tesis Doctoral

Álvaro Ortega Carrión

Madrid 2017

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de biología.



Función del motor molecular miosina no muscular II-B en la regulación mecánica de la activación de los linfocitos T y la sinapsis inmune.

Memoria presentada por el licenciado en biología:

Álvaro Ortega Carrión

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis: Miguel Vicente Manzanares, Doctor en Ciencias Químicas,
Científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa.

Madrid, 2017

Miguel Vicente Manzanares, Doctor en Ciencias Químicas, Científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que Álvaro Ortega Carrión, licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

Función del motor molecular miosina no muscular II-B en la regulación mecánica de la activación de los linfocitos T y la sinapsis inmune.

Revisado este trabajo, el que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y autoriza su presentación para ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid a 05 de Mayo de 2017.

Fdo. Doctor Miguel Vicente Manzanares

May the (mechanical) force be with you

El éxito no es definitivo, el fracaso no es fatídico. Lo que cuenta es el valor para continuar.

Winston Churchill

Agradecimientos

En primer lugar quiero nombrar a Francisco Sánchez Madrid y Manuel Ortiz de Landázuri, por haber creado el Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa y haberme acogido cuando llegue hace 6 años como residente, ya que han sido los mejores años de mi vida y he sido muy feliz aquí.

La ciencia y el doctorado se han comparado con muchas cosas, desde un tour de Francia, una carrera de fondo o un esfuerzo de todo un equipo de científicos, estoy de acuerdo con todas esas definiciones aunque para mí, es sobre todas las cosas una aventura. Todas las personas que voy a nombrar ahora me han ayudado a terminar esta aventura de la ciencia:

Un saludo y todo mi cariño para mis padres Manolo y Maribel, mi tía Carmen y toda mi familia, sin ellos nada sería posible.

Mi especial agradecimiento y cariño para el doctor Miguel Vicente Manzanares, mi director de Tesis que siempre me ha ayudado y enseñado muchísimo estos años de Tesis Doctoral, al que considero un grandísimo científico, con un rigor, una dedicación absoluta y un amor por la ciencia que no deja de sorprenderme día a día, siendo además una grandísima persona siempre dispuesto a ayudar a todo el mundo, enseñar al que lo necesita y compartir sus conocimientos y apoyo al que se lo pide.

En la parte clínica no quiero olvidarme de Cecilia Muñoz Calleja, que siempre tuvo un montón de enseñanzas, sonrisas y buenos gestos hacia mi persona y como dice alguien a quien quiero mucho: “Cecilia tiene toda la inmunología en la cabeza”, desde luego es un buen resumen de Cecilia.

En primer lugar quiero agradecer a la gente que me ha ayudado directamente tanto con la tesis como con el paper:

Noelia Blas Rus, que desde la primera conversación que tuve con ella me ha estado ayudando y ha mantenido su cariño y ayuda estos años, entramos casi a la vez y desde luego siempre ha sido una gran compañera de viaje. Cristina que es una persona maravillosa a todos los niveles, buena compañía y amiga, un ancla en el que apoyarte cuando el mundo se está volviendo loco poco a poco, mi especial recuerdo para Vanessa que nos ayudó mucho como maestra de la retro transcripción, nos hizo sentirnos parte de Halloween con sus golosinas y sus adornos y finalmente por dejar que los norteos y la ciencia monopolizáramos a Miguel, Alicia norte que nos ayudó cuando el proyecto era un recién nacido, Laura con su sonrisa, cariño, ganas de trabajar en el proyecto, ayudar a todo el mundo, su timidez y su buen gusto por la música, María Navarro con sus consejos, y ayuda con el paper y la Tesis y por su sapiencia científica y su buen hacer, María Millán más lista que nadie que cuando acabe con sus inseguridades acabara comiéndose el mundo y sin olvidarme de Irene Ríos, que fue la primera en trabajar en esta maravillosa historia y como no a Víctor, mentor, amigo y maestro una de las personas que más quiero del hospital de la princesa, que con una paciencia infinita y un humor genial.

Más allá del trabajo científico, de la primera compañera que quiero acordarme es de Beatriz Colom, que fue con la primera persona con la que hable cuando recién sacada la plaza fui a visitar todos los hospitales y me conto todas las cosas que se hacían en la Princesa y las opciones que teníamos como residentes, también me acuerdo de ese día de Itxaso Portero, que con su timidez habitual prefirió que fuera Bea quien hablara conmigo Bea y no ella, y a María Ángeles Vallejo, que me pidió que esperara a Paco en la puerta del despacho casi una hora... sin mucho éxito al final.

Quiero acordarme de la gente de mi laboratorio, Rocío la persona más trabajadora del mundo, siempre dispuesta a ayudar, con su factor de corrección temporal, su maña para las manualidades, sus pinturas y sus valores hacen de ella una persona genial que siempre merece la pena tener cerca y de Alba que con su alegría

y forma de ver el mundo siempre demostró que se pueden hacer las cosas con otro espíritu y pudo abrir mi mente a otras realidades y opiniones y finalmente Lidia, con su coleta y sus "cosis", que aunque estuvo poco tiempo en el laboratorio fue la que me enseñó a manejarme en cultivos (cultivis) y a hacer mi primer Western.

Sin olvidarme tampoco de todos los estudiantes que han pasado por aquí y también que han formado parte de la panda de los Norteños (gracias a Miguel) me han ayudado estos años y nunca los olvidare, Andrea siempre con algún viaje o una buena causa en la cabeza; Eric, que aunque estuvo muy poco tiempo siempre le tiene todo el servicio en el recuerdo; Estibaliz alias "alegría" que a pesar de eso era una chica seria, trabajadora e hipocondriaca; Clara una persona maravillosa que combina la sabiduría de una persona madura y la felicidad y entusiasmo de una niña; Celia una excelente ingeniera que le da mil vueltas a gente que le dobla la edad en cuanto a cultura, educación y amabilidad. Lucia siempre con una sonrisa y la cabeza llena de sueños y Yunaira que nunca sabes cuándo va a aparecer

Mi mayor cariño para mis mejores amigos, el grupo big bang theory o los 4 fantásticos.

Eugenio, una de las personas más listas, buenas y nobles que he conocido, que a pesar de su insondable y falsa maldad siempre esta con los que más sufren o lo necesitan, con una paciencia infinita y un montón de buenos consejos, siempre dispuesto a organizar las cosas y que siempre antepone los demás a uno mismo. Rafa, mi más y mejor antiguo amigo en este servicio, que ha pasado de sicario a Doctor en estos años, pero siempre ha mantenido su buen humor, su amistad y sus quejas, una de las personas más nobles y desinteresadas del mundo, que SIEMPRE que lo he necesitado ha estado ahí ya sea para ayudarme, echarme un mano o perdonarme, con una altura moral que deja la mía a la altura del betún. Javi, que fue el último en unirse al grupo pero es un tío genial, divertido, ocurrente con el que conecté enseguida, con el que he pasado ratos geniales y comparto con él una raíz ancestral (mi padre es andaluz), siempre dispuesto a hablar de cualquier cosa y a pasar un rato conmigo o dar una buena idea o hacer una broma en el momento clave. Más allá del grupo clásico, quería también destacar a Santi, el Spiderman de los 4 fantásticos, que se unió al equipo más tarde pero que todos le queremos mucho, con su retranca, su personalidad y todo el arte que tiene, ya sea con los pinceles, en el laboratorio o en la vida real y a David, que salía de tanto en tanto en nuestros episodios pero siempre se hacía querer con su personalidad tan característica y divertida, creo que diré "que pasa equipo" hasta el día que me muera, mientras "fuchico" alguna trama.

También quiero acordarme de todos los residentes que no he nombrado antes, como Carlos, que aunque nunca coincidimos como residentes, siempre le pondré en este grupo, un tío serio y formal que nunca sabes cuándo va a soltar una broma magnífica, Paco que aunque coincidimos poco tiempo fue al primero al que vi usar un Clitómetro de flujo, Alicia alias APF, que es única a pesar de tener muchos clones, Alberto que era una maravillosa persona ayudando y un gran médico, Jorge que siempre sabía qué hacer y decir en todo momento, Eva, mi co-R a la que solo quiero decir que quería mucho, Federico Herrera Santiago Jesús, con sus "que pasa guapísima" siempre fue una alegría tenerle en el servicio y en urgencias, Ana Marcos, con su rock, sus transwells y sus ganas por hacer ciencia siempre ha sido el pegamento del grupo de los residentes, Candela una amiga genial, siempre riéndose y con alguna broma rara en la cabeza que acaba de ver en internet, la cual nos quisieron robar sin éxito los del clínico, Verónica, mi amiga capitana del ejército, siempre tan humilde pero que vale mucho, Ana Alcaraz que nos cuida cuando nos podemos malos, pero que está deseando ser una gran científica y que me ayudó cuando más lo necesite y Tamara Matéu que hace que las cosas que le gustan me parezcan geniales y tiene un espíritu y una sonrisa que disipan cualquier nube por muy oscura que sea.

Otro del que no quiero olvidarme es de Pablo, el capitán Hipoxia, un tío genial y el que creo que es el mejor científico joven de los que están en la princesa, seguro que tendrá un futuro genial como científico y nunca olvidará sus raíces. También mi cariño para Norman, con sus ocurrencias, su incesante búsqueda de cotilleos, su sencillez y todas las cosas que hacen de él una persona especial. Un saludo para Javier López, siempre paseando por el servicio y hablando con todo el mundo mientras trabaja como un campeón y también para Dani Torralba, Irene y Ana Rodríguez.

De Pacos-1 a Ursa que lleva seis años siendo un ejemplo de dedicación y esfuerzo, Raquel con su madridismo acérrimo, Ángela siempre esforzándose y Noa toda una institución en la princesa.

De Pacos-2 con cariño a Alicia Vara por nuestras conversaciones de pasillo sobre Juego de Tronos, Hortensia que siempre puso una nota de sensatez y calma en el laboratorio y Lola que se unía a nuestras conversaciones con una sonrisa aunque a veces no se enteraba de lo que decíamos. Un abrazo para Montse y las chicas Top, Tathiana o la Tati y mi italiana favorita, Giulia

De High Tech, quiero acordarme de Raquel (pimpollo), que aunque ya no está por la princesa me ayudó mucho al principio en las guerras de los congeladores, Elena que al final se volvió friki y madre, de Alberto que era tan callado al principio, de Dani y Jaime, mi canario favorito y el segundo gallego que mejor me cae, Tamara Oliva digna ciudadana de Coslada, Javi Sevilla un tío genial con el que se puede hablar de todo y siempre con algo bueno que decir y sin olvidarme de Cintia, una buena amiga que me ha ayudado mucho estos meses y que siempre estará en mi memoria.

Mi cariño para otros Urzainquis, entre ellos como no la jefa, Ana, que siempre recordare con mucho aprecio a pesar de que dice que los niños nunca crecen, todo mi cariño para María de la Fuente, por su interés y aprecio, por su inocencia y su optimismo, gracias por los ánimos, la compañía y las ganas de vivir. Tanto en el labo como en el mundo real espero que consigas tus sueños amiga mía. Marina que es como una hermana pequeña para mí, con sus cosas del toreo y sus ganas de ser enfermera María García Blanco, que espero que sea un gran médico y como no a todos los otros estudiantes que han pasado por el labo como JC y Estefanía por nombrar a alguno de todos ellos y un saludo para Santos.

De Reuma, un abrazo para Amalia, que al final hemos compartido generación, barrio, universidad, carrera y hospital y como no a Isidoro que nos ayudó con las becas y a Ana, que seguro que puede con todo.

Un saludo también para la gente de Cecilia, como Cristina, Raquel, Eva, Paula y a Yaiza, con la que practicamos juntos el famoso puente biotinilado, sin olvidar, como no a Bea rubia, que aunque ya se ha ido compartimos cinco años en el hospital, una chica dedicada a nobles causas, y que nunca dudo un momento en ponerse de parte de los más débiles o ayudar al que más lo necesita.

Mi agradecimiento para los técnicos de clínica, como Carmen, Reyes, Pilar, Isabel y Manuela, que han estado ayudándome a salvar vidas desde el primer día en clínica, con todo mi cariño y recuerdo para Ana Ramírez, que fue con la primera persona que hable el primer día de mi residencia y todos estos años me ha ayudado muchísimo, sin olvidarme de Arantxa que aunque coincidió poco conmigo como tutora de residentes creo que ha sido un gran fichaje para la prince y Margarita que me enseñó que había que ser cocinero antes que fraile.

A mis compañeros y profesores de carrera en la Autónoma, todos ellos biólogos y alguno que se quedó en el camino con una llamada especial para Esther y Dani, los dos abrieron el duro camino de la Tesis y aun mantengo con ellos una relación de un montón de años y mucho cariño.

Un recuerdo para mis amigos de Quimera, consiguieron mantenerme en la realidad con grandes dosis de fantasía, en especial Marc, Guillermo, Jorge, Miguel y David (mi gallego favorito), al igual que mis otros frikis, Alfonso, Miguel, Gon, Abril, Luis (sí, se llama así) mi tocayo Álvaro y el otro Jorge. Así como Javi y Gonzalo que llevamos siendo amigos más de 20 años y siempre estáis ahí.

Gracias a Todos!!!!

Índice

Agradecimientos 11

Índice 14

Resumen 16

Abreviaturas..... 17

1. Introducción..... 20

 1.1 La sinapsis inmunológica en la activación de los linfocitos T: similitudes y diferencias con la sinapsis neuronal 21

 1.2 Modelo espacio-temporal de la formación de la SI 23

 1.2.1 Contactos iniciales (exploratorios) 23

 1.2.2. Activación del complejo TCR/CD3 y señalización temprana 25

 1.2.3 Adhesión mediada por integrinas en el contexto de la SI 26

 1.2.4 El citoesqueleto de actina en la SI 28

 1.2.5 Microtúbulos y secreción polarizada 32

 1.2.6 Activación del linfocito T 33

 1.3 Miosina no muscular de clase II 35

 1.3.1 Isoformas de MHCII y parálogos de NMII..... 39

 1.3.2 Regulación de la Miosina. 42

2. Objetivos:..... 44

3. Material y Métodos..... 45

 3.1 Células: 45

 3.2 Anticuerpos y Reactivos: 47

 3.3 Otros reactivos: 49

 3.4 Anticuerpos secundarios para Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo: 50

 3.5 Plásmidos y siRNAs, transfección celular: 50

 3.6 Citometría de Flujo: 51

 3.7 Activación de PBL y células T para la medida de expresión de NMII por inmunoblot y citometría de Flujo:..... 51

 3.8 Conjugados celulares para análisis de Sinapsis Inmune mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia y Confocal: 51

 3.9 Ensayos de migración en cámaras de Boyden modificadas (Transwell): 52

3.11. Microscopia Confocal y TIRF: 53

3.12 PCR cuantitativa en tiempo real: 54

3.13 Western Blot: 54

4. Resultados..... 56

4.1 La NMII-B se expresa en linfocitos T humanos 56

4.2 Los niveles de NMII-B se incrementan en respuesta a PHA, Il-2 y la estimulación vía TCR/CD3..... 62

4.3 La NMII-B controla la polaridad anteroposterior los linfocitos T y la redistribución de marcadores del urópodo celular 69

4.3 La NMII-B regula la activación de las células T en respuesta a estímulos TCR dependientes 81

4.4 La NMII-B determina la extensión y segregación molecular del contacto de la célula T con la CPA.... 84

5. Discusión 95

6. Conclusiones..... 110

7. Referencias 111

Resumen

Los linfocitos T se activan en respuesta a señales inmunogénicas y proliferativas que promueven, además de su activación, una profunda reorganización de la arquitectura del citoesqueleto. Este proceso está mediado por el reconocimiento de una señal antigénica peptídica presentada en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por parte del receptor específico de los linfocitos T (TCR). Este reconocimiento es el núcleo de un evento de interacción célula-célula entre el linfocito T y una célula que presenta el antígeno específico (CPA), denominado sinapsis inmune (SI). Este proceso implica la detención de la migración del linfocito T y la exploración de la superficie de la CPA. Si el TCR (presente en la superficie de la célula T) reconoce el complejo MHC: péptido (en la superficie de la CPA) se produce una reorganización completa de la célula T para optimizar el proceso de activación e iniciar la función efectora de la misma. Este proceso tiene un importante componente espacial que incluye la segregación de componentes de la membrana, incluyendo el complejo TCR/CD3 y receptores adhesivos de la familia de las integrinas.

El estudio de los motores moleculares asociados a los microfilamentos como la miosina no muscular IIA (NMII-A) ha revelado que esta molécula genera tracción y contracción celular que facilita la migración de los linfocitos T. No obstante, la NMII-A no es el único motor molecular con posibles funciones en este proceso. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de la función del motor molecular miosina no muscular IIB (NMII-B), un parólogo de alta carga y baja velocidad. Este parólogo determina la polaridad anteroposterior en modelos migratorios neuronales y mesenquimales y media la inhibición por contacto en modelos epiteliales. Mientras que los datos de expresión de NMII-B en los linfocitos T eran contradictorios, su función específica y su dependencia del parólogo principal expresado en células T (NMII-A) permanecían inexploradas. Este trabajo se ha basado en la hipótesis de que la NMII-B controla la polaridad de los linfocitos T humanos durante la migración celular y el establecimiento de la SI. Demostramos que la NMII-B se expresa a niveles bajos en células T naïve humanas y que se induce tanto a nivel de mRNA como de proteína en respuesta a señales mitogénicas y antigénicas de manera dependiente de la cascada de las MAP quinasas. Además, este parólogo se expresa a niveles más elevados en linfocitos T de memoria humanos que los naïve en homeostasis. A nivel celular, la NMII-B se localiza en el urópodo de los linfocitos T polarizados y es esencial para la adquisición de esta morfología, así como la migración quimiotáctica de los linfocitos T hacia CXCL12. Por otra parte, el silenciamiento de NMII-B en células T altera la morfología del contacto entre la célula T y la CPA. La localización de NMII-B en la zona distal del contacto así como la distribución dispersa de los marcadores de los anillos de activación en células deplecionadas de NMII-B sugiere que este motor actúa como un “localizador” del extremo del contacto inhibiendo la protrusión, ya que su ausencia exacerba la polimerización de actina en la zona de contacto causando un incremento de la zona de interacción entre las dos células e incluso produciendo eventos ocasionales de entosis de la CPA. Estas alteraciones causan una activación deficiente de la célula T, postulando el papel de NMII-B como un facilitador de la activación de los linfocitos T.

Abreviaturas

- 2/3 D: dos/tres dimensiones.
- A, Ala: Alanina.
- ADAP: Proteína adaptadora de la adhesión y la desgranulación (Adhesion and degranulation-promoting Adaptor Protein).
- ADF/Cofilinas: Factor de despolimerización de actina (Actin-Depolymerising Factor).
- ADN: Acido desoxirribonucleico.
- ADP: Adenosina difosfato.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- Arp2/3: Proteínas relacionadas con la actina (Actin-Related Proteins 2/3).
- ATP: Adenosina trifosfato.
- Cdc-42: Proteína del ciclo de división celular 42.
- CDR: Regiones determinantes de complementariedad.
- CK2: Caseína quinasa 2.
- CPA: Célula presentadora de antígeno.
- cSMAC: Complejo supramolecular de activación central.
- dSMAC: Complejo supramolecular de activación distal.
- EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetra-acético.
- ELC: Cadena ligera esencial.
- F-Actina: Actina filamentosa (polimerizada).
- GFP: Proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein) .
- GTPasa Rap1: Proteína GTPasa relacionada con Ras 1.
- IgG: Inmunoglobulina
- ICAM-1: Molécula de interacción celular 1 (Inter Cellular Adhesion Molecule-1)
- ICAM-3: Molécula de interacción celular 3 (Inter Cellular Adhesion Molecule -3).
- Il-2: Interleuquina 2.
- ITAM: Motivo inmunoreceptor basado en la tirosina (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)
- LFA-1: Antígeno asociado a la función de linfocito 1 (Lymphocyte Function-Associated antigen-1).
- Map quinasas: Proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein kinases).
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex).
- MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.
- MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.

MHCII: Cadena pesada de miosina II (non-muscle myosin II heavy chain).

MHCII-A/B/C: Cadena pesada de miosina II A/B/C (non-muscle myosin II heavy chain isoform A/B/C).

MLC: Cadena ligera de miosina (véase RLC).

MLCK: Quinasa de la cadena ligera de miosina.

MRCK: Quinasa relacionada con la distrofia miotónica de unión a Cdc42 (Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase)

MTOC: Centro organizador de microtúbulos.

Nck: Proteína adaptadora de la región no catalítica de la tirosina quinasa (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1).

NMII: Miosina II No Muscular (non-muscle myosin II).

NMII-A/B/C: Miosina II no muscular, paralogo A/B/C.

OLS: Órganos linfoides secundarios.

PBLs: Linfocitos de sangre periférica (Peripheral Blood Lymphocytes).

PBMCs: células sanguíneas humanas mononucleares (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PHA-L: Fitohemaglutinina L.

Pi: Fosfato.

PKC: Proteína quinasa C .

PKC θ : Proteína quinasa C theta.

pSMAC: Complejo supramolecular de activación periférico.

RapL: Ligando de proteína relacionada con Ras de linfocitos.

RhoA: Miembro A de la familia de genes homólogos de Ras (Ras HOmolog gene family member).

RIAM: Molécula adaptadora de Rap (Rap1GTP-interacting adaptor molecule).

RLC: Cadena reguladora ligera (regulatory light chain).

ROCK: Quinasa de dominio super-enrollado asociada a Rho (Rho associated coiled coil kinase).

S, Ser: Serina.

SDF1/CXCL12: Factor 1 celular derivado del estroma.

SD: Desviación estándar.

SI: Sinapsis Inmune.

siRNA: RNA pequeño de interferencia (small interference RNA).

shRNA: RNA horquillado de interferencia (small hairpin RNA).

SLP-76: Dominio SH2 de la proteína leucocitaria de 76kDa (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa).

SMAC: Complejo supramolecular de activación.

SWA: Síndrome de Wiskott Aldrich.

T, Thr: Threonina.

TBS: Buffer salino Tris.

TCR: Receptor de células T.

TIRF-M: Microscopía basada en reflexión interna total de fluorescencia (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy).

TRPM6/7: Receptor iónico transitorio relacionado con melastanina 6/7.

VLA-4: Proteína de activación tardía 4 (Very Late Activation- 4).

VLA-5: Proteína de activación tardía 5 (Very Late Activation- 5).

Wasp: Proteína del síndrome Wiskott Aldrich.

Wip: Proteína asociada con la proteína Wasp.

Wire: Proteína asociada con Wip.

1. Introducción

Los linfocitos T (también conocidos como células T) son un grupo de leucocitos esenciales para la generación de la respuesta inmune adaptativa en vertebrados. Sus progenitores se producen en la médula ósea en respuesta a una serie de estímulos, desde donde viajan al timo, para completar su diferenciación a células T competentes. Los linfocitos T expresan un receptor de antígeno (TCR) en su membrana que es específico para antígenos exógenos. Este receptor es clave durante el desarrollo y maduración de los linfocitos T en el timo para seleccionar aquellas células que reconocen antígenos extraños al organismo y eliminar células T que reconocen antígenos propios, ya que la maduración de estos últimos causaría enfermedades autoinmunes. Este proceso de selección tímica se basa en el reconocimiento de antígenos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estos antígenos, reconocidos por el TCR, permiten a la célula T discriminar antígenos propios de extraños en un proceso que transforma la intensidad de la señal en supervivencia (selección) o eliminación (delección). La intensidad de la señal depende en gran medida de la afinidad de la interacción TCR: MHC. Una vez completado el proceso de selección de las células T, éstas abandonan el timo como linfocitos T *naïve*, lo que significa que son inmunocompetentes para un antígeno específico no propio, con el que aún no han entrado en contacto en la periferia. Los linfocitos T patrullan constantemente el organismo “buscando” su antígeno específico. Esta búsqueda se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios (OLS, también conocidos como ganglios o nódulos linfáticos), en los que los linfocitos T *naïve* forman contactos con células dendríticas presentes en los OLS que transportan antígenos desde la periferia procesados y asociados al MHC. Los contactos entre linfocitos T y células dendríticas (y también otras células presentadoras de antígeno, o CPA) pueden ser de larga duración (>24h) y adoptan una conformación muy concreta, semejante al contacto entre un terminal pre- y post-sináptico en el sistema nervioso, lo que se conoce como sinapsis inmunológica (SI). Este trabajo de Tesis Doctoral ha tratado de determinar el papel de un regulador clave de la organización del citoesqueleto de los linfocitos T humanos, la miosina no muscular de clase II-B, (NMII-B) en la formación de la SI entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno.

1.1 La sinapsis inmunológica en la activación de los linfocitos T: similitudes y diferencias con la sinapsis neuronal.

La Sinapsis Inmunológica (SI) es un evento clave en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa esencial para la correcta activación de los linfocitos T. Los primeros estudios *ex vivo* de este proceso fueron realizados por Norcroos en los primeros años de la década de los 80 (1). El término “Sinapsis Inmune” fue acuñado por Paul y Seder en una revisión publicada en 1994 (2), para reflejar las similitudes entre los contactos axón-dendrita del sistema nervioso y estos contactos inmunes, que incluyen asociaciones estables a lo largo del tiempo en una porción pequeña de membrana, así como la señalización polarizada desde un terminal pre-sináptico (en este caso la CPA) hacia un terminal post-sináptico (la célula T). Las mejoras en las técnicas de microscopía durante los años 1990 y el descubrimiento de la *green fluorescent protein* (GFP) y sus derivados permitieron estudiar con detalle la localización subcelular de distintos componentes involucrados en la formación de la SI, incluyendo receptores y moléculas de señalización. Estos descubrimientos eclosionaron en publicaciones seminales de los grupos liderados por, Mike Dustin, Andrey Shaw y Avraham Kupfer (3-5), que redefinieron la SI como la manifestación física de la activación de los linfocitos T. La segregación de receptores y moléculas de señalización en la zona a través de la cual los linfocitos T contactan con la CPA es un reflejo funcional del establecimiento de la SI, que permitió la definición de dominios funcionales de activación en la zona de interacción de los linfocitos T con la CPA (4). Es importante destacar que aunque el establecimiento de la SI requiere moléculas de adhesión que interaccionan con ligandos invariantes (por ejemplo la integrina LFA-1 de los linfocitos T interacciona con ICAM-1 expresado en la membrana de la CPA), este proceso requiere el reconocimiento específico del antígeno dependiente del receptor de antígeno del linfocito T (TCR). El MHC puede ser clase I, que se expresa en todas las células de organismo y presenta antígenos de la vía endógena, marcando a la célula presentadora para su eliminación por linfocitos T citotóxicos (CD8); o clase II, que define a las células CPA “profesionales” y que presenta antígenos a los linfocitos cooperadores (CD4).

La interacción específica entre el TCR expresado en la superficie de los linfocitos T CD4+ y el MHC-II cargado con un antígeno específico en el ganglio linfático produce la activación del linfocito T CD4+, caracterizada por un aumento de la expresión de marcadores de activación tales como como CD69, citoquinas así como un incremento de su capacidad proliferativa. Por su parte, los linfocitos T CD8+ se

activan en dos pasos. En el primero, el linfocito T CD8+ naïve interacciona con una célula dendrítica que presenta antígenos capturados por la vía exógena asociados a MHC-I (6). Este proceso, denominado “presentación cruzada” (llamado así porque los antígenos de la vía exógena se presentan asociados a MHC-I, en vez de a clase II como habitualmente), prepara funcionalmente al linfocito T CD8+, un proceso denominado “armado” (“*priming*”) (7). Una vez armado, el linfocito CD8+ es capaz de eliminar células diana que presentan la misma combinación de MHC-I: antígeno que la CPA utilizó durante el armado inicial de la célula CD8. En este trabajo nos hemos centrado en el establecimiento de sinapsis entre linfocitos T CD4+ y CPA.

Las similitudes entre la sinapsis neuronal y la SI no se limitan a la estructura del contacto, sino que se extienden también al aspecto funcional (8). En el caso de las neuronas, la señal se transmite a través de mediadores solubles (neurotransmisores). En el caso de la SI, la señal está mayoritariamente anclada a la membrana del terminal pre-sináptico (complejo MHC: antígeno), lo que requiere proximidad espacial entre la membrana de los dos terminales. En la SI también existe tráfico de mediadores no anclados a la membrana. En general no se trata de mediadores solubles, sino incluidos en microvesículas, exosomas u otras estructuras membranosas. Este tráfico es mayoritariamente retrógrado, de la célula T a la CPA (9).

Una vez establecida la interacción entre el receptor específico de antígeno del linfocito T (TCR/CD3), la señal de activación se propaga verticalmente por diversas cascadas de señalización hacia el núcleo, induciendo la activación de programas transcripcionales que activan al linfocito T. Sin embargo, este proceso no sólo depende de la transcripción. Por ejemplo, es necesario que otros receptores adhesivos se activen (para mantener el contacto T:CPA). La célula también necesita reposicionar y activar distintos orgánulos y elementos celulares, principalmente el citoesqueleto. Esta reorganización, junto con el tráfico de receptores y componentes de señalización desde y hacia la membrana plasmática, controla la intensidad y duración del contacto entre la célula T y la CPA. Este contacto puede durar desde unos pocos minutos (por ejemplo, entre linfocitos T CD8+ armados y células diana) hasta 24-48h (entre linfocitos CD4 naïve y células CPA en el ganglio).

Estas diferencias implican un significado diferente del concepto de plasticidad sináptica inherente a ambos modelos. En el sistema nervioso, la plasticidad sináptica se refiere a las modificaciones que ocurren en los terminales post-sinápticos a partir de los cuales la señal se consolida y se adapta en función del grado de

excitabilidad de la neurona. En el contexto del sistema inmune este término se utiliza para describir los cambios funcionales del linfocito T producidos por la formación de una sinapsis estable, que incluyen la activación de los linfocitos T colaboradores o citotóxicos naïve, la función efectora de los linfocitos T citotóxicos y la anergia funcional que genera la apoptosis durante la selección tímica de los linfocitos T inmaduros. No obstante, la principal manifestación del fenómeno de plasticidad funcional es el desarrollo de la memoria inmunológica, en el cual se generan linfocitos T de larga vida media que responden con mayor eficacia a los antígenos a los que respondieron con anterioridad.

1.2 Modelo espacio-temporal de la formación de la SI.

El estudio de la SI se puede dividir en diversos episodios temporales mediados por diversos tipos de moléculas efectoras. Estos eventos no están aislados en el tiempo, sino que pueden solapar.

1.2.1 Contactos iniciales (exploratorios).

Los contactos exploratorios están mediados por interacciones de baja afinidad entre ligandos expresados por la célula CPA y receptores en el linfocito T. Los ligandos son mayoritariamente moléculas que pertenecen al glicocáliz celular, que establece interacciones y repulsiones dependientes de carga eléctrica entre células T y las CPA (10). Otros contactos de baja afinidad son mediados por proteínas glicosiladas como pueden ser las galectinas. Estas proteínas glicosiladas se unen a moléculas del TCR con baja afinidad y no producen la activación del receptor (11). De hecho, el reconocimiento antigénico vía MHC compite con la galectina para activar el TCR/CD3 (11).

Los receptores de quimiocinas también tienen un papel en la formación y en la posterior estabilización de los contactos iniciales de la SI. Estos receptores desempeñan una función de co-estimulación del TCR. También tienen función quimiotáctica, mediando la atracción de la célula T a los sitios anatómicos donde los linfocitos T maximizan la oportunidad de interactuar con CPA. Finalmente, están implicados en la reorganización morfológica de la célula, controlando por ejemplo los niveles de F-actina en la célula T (12). Finalmente otros contactos exploratorios dependen de interacciones específicas entre proteínas. Por ejemplo, la integrina LFA-1 (α L β 2) es expresada por la mayor parte de CPA “profesionales”, e interactúa en baja afinidad con ICAM-3 del linfocito T (13). De manera similar, LFA-3 (en la CPA) interactúa con CD2 (en

el linfocito T). El significado biológico de estos contactos de baja afinidad es formar interacciones transitorias entre la célula T y la CPA para permitir la interacción del TCR con el complejo MHC: péptido. Si la afinidad entre el TCR y el péptido cargado por el MHC es suficientemente alta, esta interacción supera las fuerzas contrarias a la adhesión generadas por el glicocálix. De igual manera, cuando la afinidad entre los dominios hipervariables (CDR) y la secuencia del péptido presentado en el contexto del MHC es baja, la repulsión mediada por el glicocálix domina y el contacto celular se resuelve. Este sistema se considera un mecanismo de prevención para asegurar la no activación del linfocito T en respuesta a antígenos con baja afinidad para su TCR, siendo de vital importancia durante la maduración tímica.

Figura I1

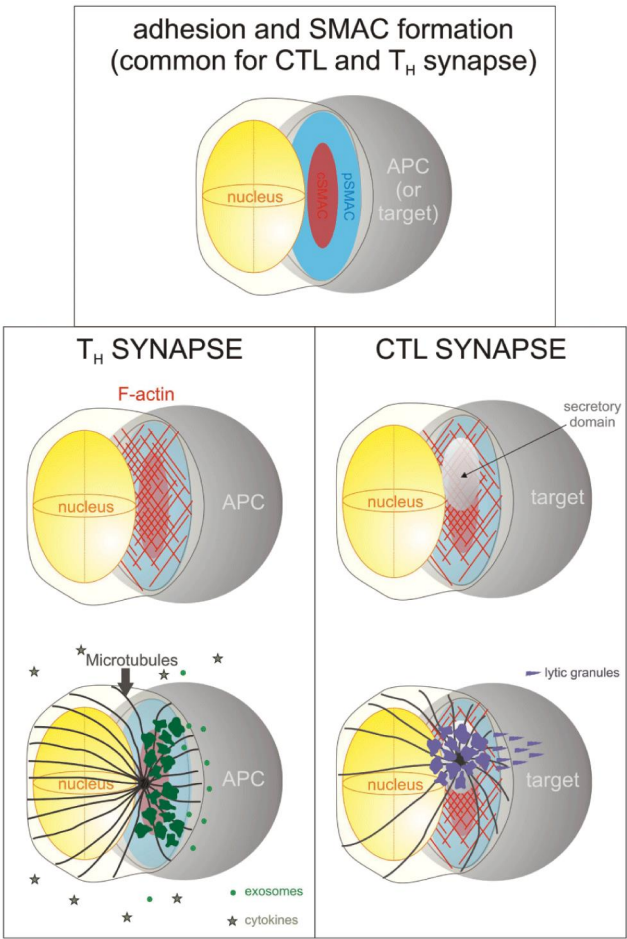


Figura I1. Eventos claves durante la formación de la Sinapsis Inmune.

El diagrama superior representa la adhesión específica del linfocito T (izquierda) con la célula presentadora de antígenos o célula CPA o APC por sus siglas en inglés (derecha) a través de su MHC de clase II y la formación temprana de los dos dominios discretos de la estructura de la sinapsis, el “central supramolecular activation cluster” (cSMAC) en rojo, que contiene el receptor específico de la célula T (TCR/CD3) y las proteínas de señalización accesorias de dicho complejo y el “peripheral SMAC” (pSMAC) en azul, en el que se disponen las proteínas de adhesión (integrinas) y sus proteínas adaptadoras. En la columna inferior izquierda se observa un esquema representativo de una sinapsis entre un linfocito T colaborador, formando una sinapsis inmune con una célula CPA profesional, los eventos claves de dicha sinapsis incluyen la acumulación de la actina en la zona de contacto entre las dos células

(esquema superior, en rojo) y la yuxtaposición del aparato secretor del linfocito T, en verde, que se dispone en la parte inmediatamente posterior de la estructura de actina así como el reordenamiento del centrosoma y la red de microtúbulos del linfocito T en la proximidad de la zona de contacto (esquema inferior izquierdo). Dicha polarización resulta en la secreción polarizada de exosomas hacia la célula CPA (esquematizadas como esferas verdes brillantes) así como la secreción no polarizada de diversas citoquinas (estrellas). En la columna inferior derecha se representa una vista esquemática de una sinapsis citotóxica entre un linfocito T citotóxico (CD8+) y su célula diana a través de su MHC de clase I, incluye la acumulación de F-actina en la zona del contacto y la formación de un dominio secretor específico de este tipo de sinapsis, en el que se observa un aclaramiento de la actina (esquema superior) y la yuxtaposición de su aparato secretor (esquema inferior derecho), el resultado de dicha sinapsis es la secreción altamente polarizada de las partículas líticas del linfocito T (granzimas y perforinas) que producen la eliminación de la célula diana.

Figura de: Ortega-Carrión A and Vicente-Manzanares M 2016 Concerning immune synapses: a spatiotemporal timeline.

F1000Research 2016, 5:418.

1.2.2. Activación del complejo TCR/CD3 y señalización temprana.

El reconocimiento antigénico del péptido presentado vía MHC por el TCR a través de sus regiones hipervariables inicia la señalización temprana mediada por el complejo TCR/CD3. Es importante remarcar que solo es necesaria la unión y el reconocimiento antigénico de unos pocos complejos TCR/CD3 para inducir la activación del linfocito (14). La adhesión y el reconocimiento antigénico vía TCR favorecen la acumulación del mismo en la zona de contacto entre las dos células, que constituye un paso esencial en la formación de una sinapsis estable (15). Esta acumulación depende de la interacción entre el TCR y el MHC, que restringe el movimiento lateral de los receptores en la membrana. Sin embargo, la acumulación del complejo TCR/CD3 es superior a la concentración del mismo estimada por modelos de difusión en bicapas lipídicas, lo que sugiere que existen mecanismos adicionales de refuerzo de este proceso. En este sentido, el citoesqueleto de actina desempeña un papel crucial en la agregación del complejo TCR/CD3 (16, 17). Un estudio reciente ha demostrado el flujo de actina cortical está ralentizado en la zona en la que los TCR/CD3 reconocen el complejo MHC: antígeno cargado con el antígeno, sugiriendo que existe una interacción entre el receptor de membrana y la actina cortical (18), esencial para una adecuada señalización vía TCR/CD3 (19). En este sentido, el cambio conformacional del TCR cuando reconoce el complejo MHC: antígeno induce la interacción y reclutamiento del adaptador Nck a la cadena CD3 ζ , pudiendo servir como un nexo temprano de la activación del complejo TCR/CD3 con la actina (20). Otro de los factores claves en la formación de la SI es el tamaño de los agregados de TCR/CD3. Existen evidencias de la existencia de agregados muy pequeños de TCR/CD3 (<250 nm, llamados nanocomplejos) incluso antes de su interacción con el MHC cargado con el antígeno. Estos nanocomplejos se generan continuamente y se observan en la membrana plasmática de los linfocitos T incluso en ausencia de estimulación (21). El modelo más aceptado implica que el contacto con una superficie que contiene ligandos específicos para el complejo TCR/CD3 (en

este caso la membrana de la CPA que contiene los complejos MHC: antígeno) induce una inmovilización inicial de los nanocomplejos de TCR/CD3. Esta inmovilización alteraría el flujo centrípeto de actina, que se dirigiría hacia la zona de mayor concentración de TCR/CD3 (17, 22), arrastrando a los otros nanocomplejos de TCR/CD3 hacia la zona de contacto a través de su interacción con la actina vía Nck (23). Este proceso se ve favorecido por factores adicionales, incluida la generación de dominios especializados de membrana como dominios de tipo tetraspanina (24) y balsas de colesterol que favorecen la inclusión de los nanocomplejos de TCR/CD3 (25). La acumulación de nanocomplejos de TCR/CD3 en la zona de contacto genera un agregado detectable por microscopía óptica de fluorescencia, denominado *central Supra Molecular Activation Cluster* (cSMAC) (26). El cSMAC concentra el TCR/CD3 junto con co-receptores adicionales (CD28, CD4) (27) y moléculas de señalización (28).

A pesar de que los principios generales de formación del cSMAC deben ser comunes, las peculiaridades de los distintos tipos de SI sugieren mecanismos específicos dependientes del tipo de linfocito T. Por ejemplo, los linfocitos CD8⁺ forman el cSMAC, pero la actina cortical se reduce en el contacto para facilitar la secreción polarizada de vesículas líticas (29), lo que implica la activación de cascadas que conducen a la despolimerización de actina local en el centro del contacto. De manera similar, las células T con un estado basal de activación más elevado, los linfocitos T de memoria y algunos modelos *in vitro* de célula T leucémica, tienden a presentar un único cSMAC de mayor tamaño, mientras que las células T naïve presentan varios SMAC de menor tamaño (30, 31). Esta divergencia en el nivel de agrupamiento del cSMAC puede deberse a diferencias en la expresión de diferentes componentes celulares que promuevan o al menos faciliten el agrupamiento del TCR. Otra posibilidad es que la señalización vía TCR/CD3 sea más intensa en estas células, que podrían considerarse “pre-activadas”, lo cual favorecería un nivel de activación basal más elevado.

1.2.3 Adhesión mediada por integrinas en el contexto de la SI.

La señalización vía TCR/CD3 no sólo se propaga verticalmente hacia el núcleo, sino que también promueve la transactivación de otros receptores en la membrana plasmática. Uno de los más importantes es la integrina LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$). Las señales que emanan del complejo TCR/CD3 inducen un aumento de la afinidad de LFA-1 por su ligando ICAM-1, que se expresa en la membrana de muchas CPA (32). Este proceso causa el

establecimiento de un contacto adhesivo estable entre el linfocito T y la CPA. La transactivación de las integrinas en este contexto esta mediada por diferentes mecanismos, incluyendo la activación de la GTPasa Rap1, que activa al complejo RapL-RIAM, así como el complejo de tres moléculas compuesto por SLP-76/ADAP/SKAP. RapL y RIAM forman un complejo unido por SLP-76 al dominio citoplasmático del TCR cuya función principal es la de atraer al adaptador de adhesión talina a la membrana plasmática (33). La talina actúa como conector entre las integrinas que median la adhesión entre la matriz o la CPA y el citoesqueleto de actina. La talina es una molécula clave en la activación de las integrinas ya que su unión a la cola citoplasmática de la cadena β de las integrinas promueve la extensión conformacional de la integrina, permitiendo su unión al ligando (34). LFA-1 es la principal integrina que media la interacción entre el linfocito T cooperador y la CPA, y también tiene un papel fundamental en la formación entre el linfocito T citotóxico y la célula diana. Es importante destacar que no todas las CPA expresan ICAMs (los ligandos principales de LFA-1), por lo que otras integrinas pueden desempeñar su papel en la sinapsis dependiendo del contexto celular, por ejemplo VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) y VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) (35).

LFA-1, talina, otras integrinas así como proteínas citoplasmáticas que forman complejos con las integrinas (en células adherentes, estas proteínas se localizan en las adhesiones focales) se sitúan en el borde exterior de la zona de contacto entre la célula T y la CPA en la SI, definiendo una estructura que se denomina pSMAC (*peripheral*), por su disposición periférica en la zona de contacto. El mecanismo de segregación diferencial de estas moléculas al pSMAC no se ha caracterizado completamente, pero está relacionado con la interacción de los complejos adhesivos con el citoesqueleto de actina a través de talina y otros adaptadores, por ejemplo vinculina, α -actinina, filamina y otros.

Figura I2

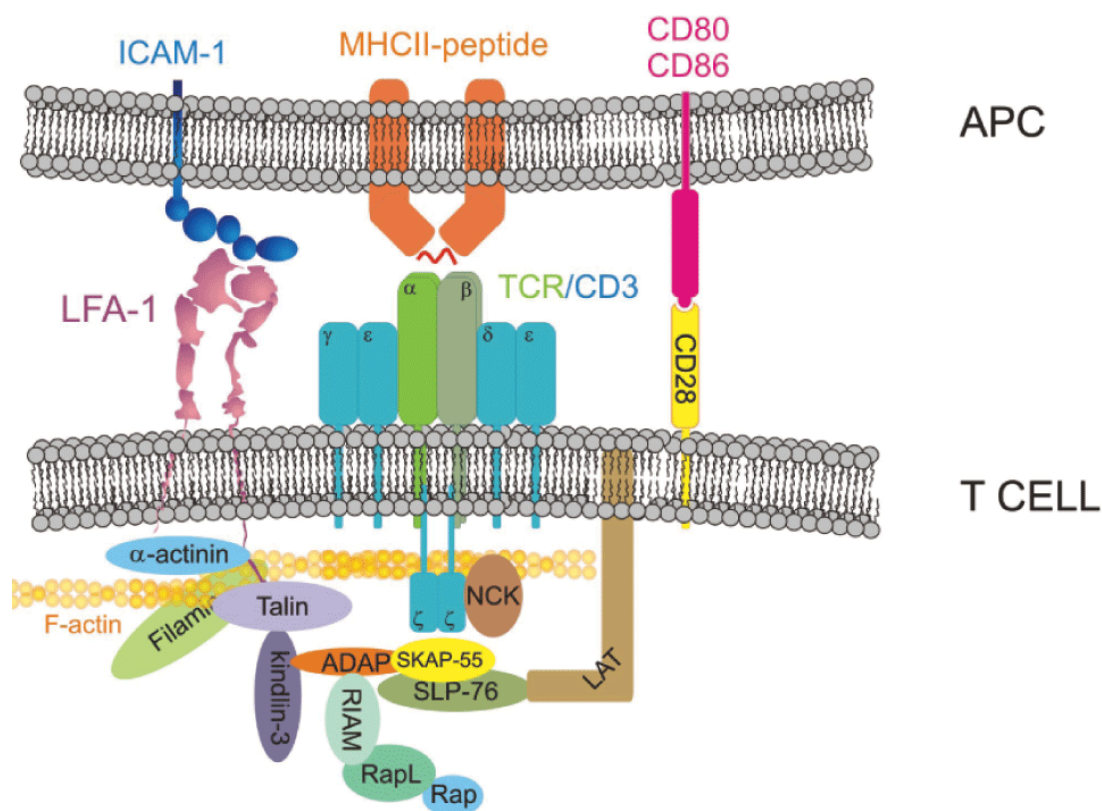


Figura I2 Principales interacciones proteicas durante la SI.

El esquema incluye el reconocimiento específico por el TCR del péptido presentado por el MHC de clase II, la señal de co-estimulación mediada por los receptores de membrana CD28 y CD80 presente en la CPA y la unión adhesiva entre LFA-1 e ICAM-1. Se observa en la figura la interacción esencial del complejo TCR/CD3 con la F-actina en la célula T para el mantenimiento de la sinapsis inmune y otras proteínas accesorias de las integrinas y de dicho complejo, incluyendo las moléculas de señalización que participan en la transactivación de la integrina LFA-1. El diagrama muestra el papel del complejo SLP-76/ADAP/SKAP-55 en el reclutamiento de kindlina-3 y RIAM en la región próxima de la integrina así como la función de Rap/RapL/RIAM en promover la asociación de la talina con la cadena β del dímero de LFA-1.

Figura de: Ortega-Carrión A and Vicente-Manzanares M. 2016. Concerning immune synapses: a spatiotemporal timeline.

F1000Research 2016, 5:418.

1.2.4 El citoesqueleto de actina en la SI.

El citoesqueleto de actina (microfilamentos) tiene un papel fundamental en la formación de la SI ya que participa en el agrupamiento del complejo TCR/CD3 y en la formación de los SMAC. Los microfilamentos no se limitan a actuar como sustrato para la interacción localizada de mediadores de la interacción entre la célula T y la CPA, sino que se reorganizan dinámicamente en respuesta a la señalización vía TCR/CD3 e integrinas, remodelando activamente la zona de contacto entre las dos células (36).

Las señales que emanan del TCR parecen dirigir la polimerización de actina. Por ejemplo, la activación conformacional del TCR promueve la asociación de la cadena ζ de CD3 al adaptador de actina Nck (20). Este proceso podría promover la polimerización de actina localizada por un proceso mediado por distintos efectores, notablemente WIP/WIRE and WASp (37). Sin embargo, existen evidencias de que la acumulación de WASp en el cSMAC implica su inactivación (38), lo que sugiere que esta asociación no promueve la acumulación de actina en esta región. Sin embargo, ensayos de adhesión a superficies bidimensionales recubiertas con anti-CD3/28 revelan que la polimerización de actina ocurre preferencialmente en la zona exterior del contacto, generando un intenso flujo centrípeto (retrógrado) de actina que promueve la acumulación del TCR/CD3 en el cSMAC, así como la desaparición de F-actina de esta región (19, 39). Este flujo centrípeto presenta aproximadamente la misma velocidad que la observada en los lamelipodios de células migratorias (40). Este hecho junto con la geometría de la actina en estas regiones, que es dendrítica, así como la exclusión de la miosina no muscular de clase II sugiere que esta región se comporta como un lamelipodio. A nivel de señalización, estos datos sugieren que la interacción entre CD3 ζ y Nck promueve la polimerización de actina cuando los agregados son pequeños (*microdominios*), y que la congregación de CD3 ζ / Nck en el centro del contacto podría ser inhibitoria.

El proceso de polimerización de actina dendrítica que se observa en la sinapsis depende de la activación de las GTPasas Rac y Cdc42 por señales que emanan del complejo TCR/CD3, así como de las integrinas. Estas señales activan al complejo Arp2/3, que promueve la nucleación de filamentos ramificados y la formación de redes de actina. El complejo Arp2/3 se localiza en regiones en las que la actina polimeriza dinámicamente, e incluye las proteínas de unión a actina Arp2 y Arp3 y otras 5 subunidades proteicas. Un modelo de nucleación dendrítica de la actina establece que el complejo Arp 2/3 es reclutado a la zona activa de polimerización donde actúa como un nucleador de la actina (41). El complejo ancla la nueva estructura filamentosa en un ángulo de 70° respecto al filamento original, lo que permite la generación de una red compleja de filamentos con estructura dendrítica (42). La activación del complejo Arp 2/3 ocurre vía WAVE/Scar (Rac) o WASP/N-WASP (Cdc42) e implica otras muchas moléculas como ya se ha comentado anteriormente tales como WIP/WIRE (WASP), Sra/Nap/Abi/Brk1 (WAVE). Todas las proteínas de la familia WASp contienen un dominio C-terminal capaz de activar el complejo Arp 2/3 (43). WASP se recluta hacia la zona de la sinapsis y participa en la formación de la estructura que permite el movimiento lateral del

TCR acoplado al MHC y sus adaptadores (44). De hecho, los portadores de una mutación en WASP padecen una inmunodeficiencia denominada síndrome Wiskott-Aldrich (SWA), que se caracteriza por una deficiente proliferación de linfocitos T dependiente de TCR y una reducción del flujo intracelular de Ca^{2+} citoplasmático en los linfocitos T activados (45). Las proteínas de la familia WASP también median el tráfico linfocitario dependiente de CXCL12, ya que dicho quimioatrayente induce la fosforilación de WASP y de algunas de las proteínas adaptadoras como Nck y Cas, que participan en la reorganización de actina durante la migración celular (46).

El rápido flujo centrípeto de actina observado en la periferia del contacto se ralentiza a medida que nos acercamos al centro del contacto (39). Esta zona de flujo más lento se asemeja a la lamela (*lamellum*) de las células migratorias en términos de velocidad de flujo y presencia de NMII-A. La NMII-A no es necesaria para el mantenimiento de la velocidad de flujo de la actina (19), pero sí para el mantenimiento del agrupamiento del TCR/CD3, lo que se observa también en complejos de linfocitos T con CPA cargadas con antígeno (47). Específicamente, la NMII-A forma arcos de haces de filamentos de actina, muy similar a los arcos de actina contráctiles que se observan en la lamela de las células migratorias (48). Los micro-dominios de TCR/CD3 parecen utilizar estos arcos de actina como líneas de guía para concentrarse en la zona central, lo que sugiere que estas estructuras facilitan la translocación centrípeta de los receptores de la SI (49).

Otras proteínas importantes en la regulación de la geometría de la actina en la SI son las proteínas de unión a actina de función entrecruzadora, por ejemplo α -actinina y filamina. Estas dos moléculas son capaces de unirse simultáneamente a la actina y a las integrinas $\beta 1$ (50, 51) y responden a la activación del TCR vía MHC (52, 53). La α -actinina pertenece a la súper familia de las espectrinas y facilita el entrecruzamiento paralelo y/o anti-paralelo de los filamentos de actina (54). Por su parte, la filamina entrecruza ortogonalmente los filamentos, dando lugar a estructuras reticuladas (55). Los linfocitos T expresan fundamentalmente filamina A (56). La filamina tienen una función esencial en la célula debido a su capacidad de interacción con la actina como proteína estructural, permitiendo la interacción de la actina con diferentes moléculas del citoesqueleto y proteínas de señalización y receptores de membrana (57). La filamina A presenta una localización diferencial en el linfocito T durante la sinapsis, debido a que se recluta a la zona de contacto entre las dos células, co-localizando con PKC θ (52).

Existen otros mecanismos que intervienen en la reorganización de la SI. La despolimerización de los microfilamentos y el posterior remodelado de los mismos es una condición indispensable para el cambio morfológico vía Arp 2/3 y la generación de la polaridad celular durante la formación de la SI (58), similar a otros eventos de polarización celular promovidos por la reorganización de la actina, por ejemplo la formación de neuritas (59). La despolimerización de actina ocurre mediante dos mecanismos fundamentales: el envejecimiento de los filamentos y su escisión, catalizada por distintos mediadores. El mecanismo mejor caracterizado de despolimerización de actina es el generado por la actividad de la ADF/cofilina. Las ADF/cofilinas, (*Actin-Depolymerising-Factor*) son una familia de proteínas muy conservadas evolutivamente (60), caracterizadas por la presencia de un dominio común de homología de unión a la actina (61). La ADF/Cofilina es el principal promotor de la despolimerización de los filamentos de actina en la célula. Su mecanismo de acción consiste en la unión lateral de la cofilina a los filamentos de actina de manera cooperativa (62), promoviendo la despolimerización de los filamentos debido a una alteración termodinámica y de las propiedades funcionales del filamento de actina (63). Además, la cofilina modifica la capacidad de unión del filamento de actina a otras proteínas de unión a actina, por ejemplo tropomiosina y miosina (64). Este mecanismo permite la generación de importantes cambios estructurales en la célula (65, 66), lo que implica una regulación espacio-temporal compleja (67).

En resumen, la organización del citoesqueleto de actina en la SI es un proceso multimolecular extraordinariamente complejo que abarca cambios locales, rápidos y transitorios en la activación de distintos compartimentos de señalización que dan lugar a una segregación molecular de receptores y proteínas adaptadoras que refleja la geometría y dinámica de los microfilamentos.

Figura I3

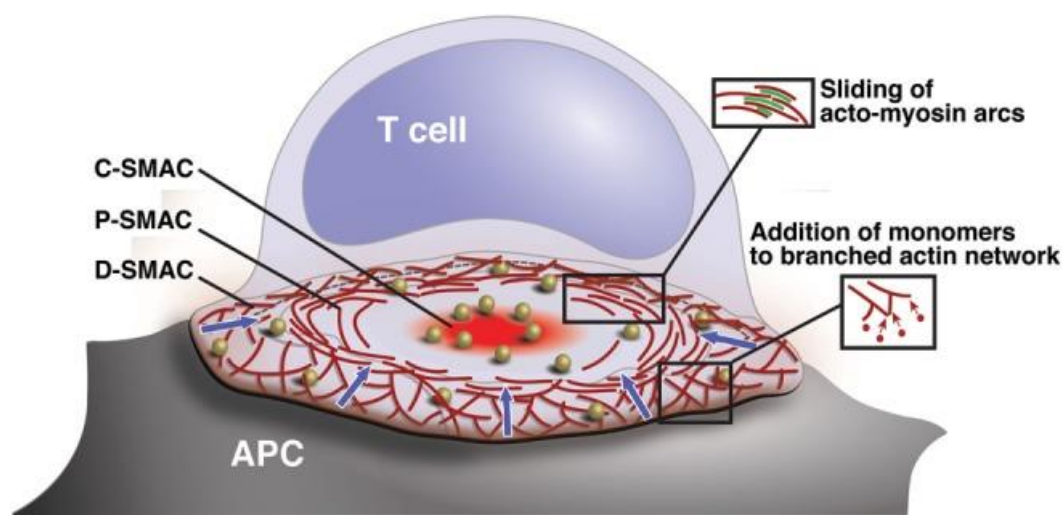


Figura I3 Arquitectura y dinámica de la actina durante la SI.

En el esquema se observa la característica acumulación de actina en la zona de contacto entre la célula T y la CPA. Según el citoesqueleto de actina de la célula T se reconoce un tercer “supramolecular activación cluster” una región rica en actina periférica denominada “distal SMAC” (dSMAC). En la figura se observa también la disposición de NMII en la zona de la sinapsis en forma de arcos, a través de su unión a la actina en el pSMAC. Los microdominios de señalización que contienen TCR característicos del cSMAC y otras moléculas de señalización (bolas de oro) se forman en la periferia de la sinapsis y son transportados por el citoesqueleto de actomiosina hacia la región del cSMAC. El movimiento del microdominio se acopla al flujo centrípeto de la red de actina (flechas azules). El flujo de actina en la zona dSMAC se debe principalmente a la adición de monómeros de actina a los extremos libres de la red de los filamentos ramificados de actina, permitiendo el crecimiento de la red de actina que se encuentran justo debajo de la membrana plasmática.

Figura de: Comrie WA and Burkhardt JK. 2016. Action and Traction: Cytoskeletal Control of Receptor Triggering at the Immunological Synapse. *Frontiers in immunology*. 7:68.

1.2.5 Microtúbulos y secreción polarizada.

La polarización impuesta por el contacto del linfocito T con la CPA durante la formación de la SI promueve, además de la activación de vías de señalización que se propagan al núcleo (descrita brevemente en la siguiente sección), la redistribución de muchos de los orgánulos funcionales de los linfocitos T así como otras redes citoesqueléticas, por ejemplo microtúbulos. En concreto, los microtúbulos se polarizan hacia la zona de contacto dirigidos por el centro organizador de microtúbulos (MTOC o centrosoma), que es reclutado hacia la SI mediante un mecanismo dependiente de dineína (68). La polarización del MTOC es esencial para la correcta activación de los linfocitos T (68) y conlleva la redistribución del aparato de Golgi, las mitocondrias, el retículo endoplasmático y los cuerpos multivesiculares (69). La polarización de los microtúbulos permite la secreción polarizada de vesículas en la zona de contacto entre la célula T y la CPA. Esta secreción polarizada es crucial en las sinapsis entre células T citotóxicas y células diana para confinar la

“señal de muerte” a la célula que está presentando antígenos exógenos asociados a clase I (70). En el caso de sinapsis mediadas por clase II, la necesidad de una secreción polarizada es menos obvia, pero está relacionada con la transmisión de información por parte de la célula T a la CPA contenida en exosomas, por ejemplo ARN cortos reguladores (71).

1.2.6 Activación del linfocito T.

Los linfocitos T se activan de manera dependiente de antígeno a través de la SI. Esta activación consiste en la expresión de moléculas y mediadores que permiten que el linfocito T realice su función efectora, ya sea eliminar células infectadas por patógenos (citotóxicos) o activar otros tipos celulares por secreción de citoquinas (colaboradores). En ambos casos, la activación produce la expansión clonal de los linfocitos T específicos para el antígeno que inicia la señal. Este proceso se inicia por el reconocimiento del complejo MHC: péptido por el TCR e implica a una serie de co-receptores o proteínas citoplasmáticas asociadas al mismo, proteínas de señalización, segundos mensajeros, etc. El reconocimiento antigénico mediado por los por las subunidades $\alpha\beta$ TCR del complejo TCR-CD3 promueve un cambio conformacional en los heterodímeros que forman las otras subunidades del completo TCR/CD3, lo que favorece la fosforilación de los dominios ITAM (Immunoreceptor Tyr-based Activating Motif) de las subunidades CD3 ϵ y CD3 ζ por Lck (72). El dominio CD3 ζ es un elemento esencial para la transducción de la señal y su fosforilación se considera como un marcador de activación “canónico” del comienzo del proceso de señalización que conduce a la activación completa del linfocito T. Los dominios ITAM constituyen plataformas de unión para los dominios SH2 de ZAP70, una proteína tirosin quinasa que se acumula en la proximidad de los complejos TCR/CD3 y fosforila el adaptador LAT en diferentes residuos de tirosina (73). Esto activa a la PLC γ , que hidroliza fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). Este fosfolípido se localiza en el dominio citoplasmático de la membrana plasmática, y su hidrólisis por PLC γ genera dos segundos mensajeros, inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Así, la señal de activación del TCR se divide en dos vías de transducción de señales: la vía del calcio; y la de las proteínas quinasa C (PKC), respectivamente (74). Estos segundos mensajeros producen la activación, inducción y transporte al núcleo del linfocito T de varios factores de transcripción cruciales para la activación transcripcional de la célula T, incluyendo NF-AT, AP1 y NF- κ B (75). La familia de factores de transcripción NF- κ B está regulada por la vía de las PKC y controla una gran cantidad de genes involucrados en la activación y metabolismo de los linfocitos T, proliferación celular y regulación de la apoptosis (76), lo

cual conduce a la expansión clonal del linfocito T una vez iniciada la respuesta inmune (77). La familia de factores de transcripción NF-AT está regulada por el calcio citoplasmático vía calmodulina. NF-AT participa en la transcripción de genes claves para los linfocitos T activados, tales como los implicados en la síntesis y liberación de IL-2, diversos receptores de citoquinas y de moléculas implicadas directamente en la proliferación celular. Otro factor de transcripción regulado por la vía del calcio es Mef2, que participa en la regulación de la apoptosis (78). Existen otros factores de transcripción que se activan a través de la estimulación del TCR, como los factores de transcripción de la familia FOXO, que participan en la regulación de la proliferación celular y de la apoptosis. El miembro más conocido de esta familia es Foxp3 que participa en la supresión de la actividad de los linfocitos T, aumentando la expresión génica de las proteínas claves de los linfocitos T reguladores (79).

Existe una serie de receptores de membrana que se inducen durante la activación de los linfocitos T. Un ejemplo es CD69, que es una proteína de tipo lectina que se considera un marcador clásico de activación de los linfocitos T (80). CD69 está implicado en la regulación del metabolismo de los linfocitos T activados (81) y su delección sistémica produce enfermedades autoinmunes (81, 82). Otros receptores inducidos durante la activación de los linfocitos T pueden modificar su grado de activación de manera independiente de antígeno. Claros ejemplos son los receptores de citoquinas. Un ejemplo de estos receptores es la subunidad del receptor de IL-2 que confiere alta afinidad (CD25). La IL-2 es el principal factor de crecimiento de los linfocitos T activados y las células T_{REG}. CD25 se expresa constitutivamente en T_{REG} y de manera inducible en linfocitos efectoros. La unión de IL-2 al complejo de alta afinidad (que contiene CD25) activa varias vías de transducción de señales que participan en la progresión del ciclo celular e inhibe la apoptosis de los linfocitos T, por ejemplo la ruta de las MAP quinasas (83), que converge en la fosforilación, activación y translocación nuclear de ERK (84). Otra vía es la cascada de las Janus quinasas (JAK), que fosforila y activa a factores de transcripción de la familia STAT. En el caso del receptor de IL-2, JAK1 fosforila STAT5 (84). Otra vía dependiente de la conversión de PIP₂ a PIP₃ por la enzima fosfatidil inositol 3-quinasa es la activación de la proteína quinasa AKT que permite la entrada al núcleo de NF-κB vía PDK-1 (85).

1.2.7 Finalización de la Sinapsis Inmune.

El contacto de las células T con las CPA termina rápidamente si el contacto no se estabiliza por el reconocimiento específico del MHC por parte del complejo TCR/CD3. En el caso de un contacto productivo, la señal termina con la activación del linfocito T (cooperador o citotóxico *naïve* en presentación cruzada) o la destrucción de la célula diana (citotóxico armado). En este último caso, la finalización de la sinapsis podría ser dependiente de la inversión de la membrana plasmática de la célula diana. En este caso, moléculas típicas de la cara interna de la membrana plasmática, como fosfatidilserina o anexina V quedarían expuestas al medio extracelular. La exposición al medio exterior de anexina V o fosfatidilserina es un evento típico del proceso de apoptosis, lo cual permitiría postular que el linfocito T citotóxico podría reconocer estas señales de apoptosis en la célula diana (86).

En el caso de los linfocitos T colaboradores o linfocitos T citotóxicos *naïve*, la señal debería estar relacionada con el nivel de activación del linfocito T. Una posibilidad es la disminución del reciclaje de moléculas del TCR exhaustas desde la membrana plasmática (87). En este sentido, se ha postulado que el cSMAC es una localización de terminación de la señal, con elevada ubiquitinación, defosforilación e internalización, mientras que la señalización vía TCR se mantiene elevada en los microdominios presentes en el pSMAC (88). De esta manera, la terminación de la señal en la SI podría explicarse por un modelo en el cual la activación completa del linfocito T conlleva el reclutamiento de la mayor parte del TCR al cSMAC, inhibiendo la mayor parte de la señal, terminando el contacto una vez se inactiven las integrinas presentes en el pSMAC.

1.3 Miosina no muscular de clase II.

Las miosinas son una súper-familia de proteínas motoras de unión a actina que generan fuerza de manera dependiente de ATP dentro de la célula y que participan de manera fundamental en casi todos los procesos celulares que incluyen movimiento y reorganización de la arquitectura celular, tales como la citocinesis, la migración celular, etc. Esta súper-familia es muy extensa, habiéndose catalogado hasta 29 miosinas diferentes de acuerdo a criterios génicos o estructurales. La miosina no muscular de clase II (NMII) pertenece a la clase II (miosinas convencionales) y es una proteína de expresión ubicua en las cuales es capaz de generar fuerzas mecánicas (también de responder a las mismas, ver más adelante) dentro de la célula o en su área de influencia. En general, las miosinas convierten la fuerza mecánica que generan en trabajo

mecánico a través de su asociación con sistemas de filamentos, mayoritariamente de actina. En algunos casos, como por ejemplo la miosina V, la molécula utiliza la fuerza que genera para desplazar cargas (vesículas) a lo largo de los filamentos. En el caso de la NMII, son los propios microfilamentos los que se desplazan, reestructurando su disposición en la célula, así como la de las moléculas y orgánulos asociados a la actina. En este sentido, la NMII es muy similar a la miosina II muscular, que forma bandas estacionarias cuya contracción/ relajación induce el movimiento de los filamentos en el sarcómero, produciendo el movimiento de los músculos (89).

Estructuralmente, la unidad funcional de NMII está compuesta por un hexámero que contiene dos cadenas pesadas (MHCII) y cuatro cadenas ligeras. La MHCII es una proteína de ≈ 220 kDa dividida en cuatro dominios: el dominio N-terminal presenta estructura globular y contiene actividad de unión a actina dependiente de Mg^{2+} así como actividad ATPasa. Ambas actividades conforman el dominio motor, que está muy conservado entre distintos tipos de miosina (90). El dominio motor se une a una larga cola helicoidal a través de una región “cuello” que también actúa de sitio de unión para dos cadenas ligeras por cada MHCII. La cola helicoidal (≈ 1000 amino ácidos) actúa como dominio de dimerización de las dos MHCII, y termina en un dominio no helicoidal corto cuya función es regular la formación de oligómeros de NMII. Las cadenas ligeras se dividen en esencial (o álcali) y reguladora (ELC y MLC/RLC, respectivamente). Ambas desempeñan una función estructural, pero la MLC además controla la función del hexámero por fosforilación de residuos específicos que catalizan la actividad ATPasa de la MHCII y controlan el plegamiento conformacional del hexámero.

La NMII puede adoptar dos conformaciones estables en la célula, una en la que la NMII es capaz de interaccionar con la actina o formar oligómeros y otra en la que es incapaz. En esta última conformación, el dominio motor de NMII interacciona con la cola de la proteína formando una estructura plegada que requiere alta velocidad para sedimentar, por lo que también se conoce como 10S (91). La conformación competente, o activa, es más extendida, con lo que sedimenta a más baja velocidad (6S). En la conformación 6S, la NMII interacciona tanto con los filamentos de actina como con otros hexámeros de NMII, formando mini-filamentos anti-paralelos de NMII (92). Estas dos conformaciones son, en principio, reversibles y la adopción de una u otra conformación está regulada por la fosforilación de dos residuos de la RLC, Thr18 y

principalmente Ser19. Estas fosforilaciones favorecen la conformación 6S y promueven la actividad ATPasa de la MHCII.

Figura I4

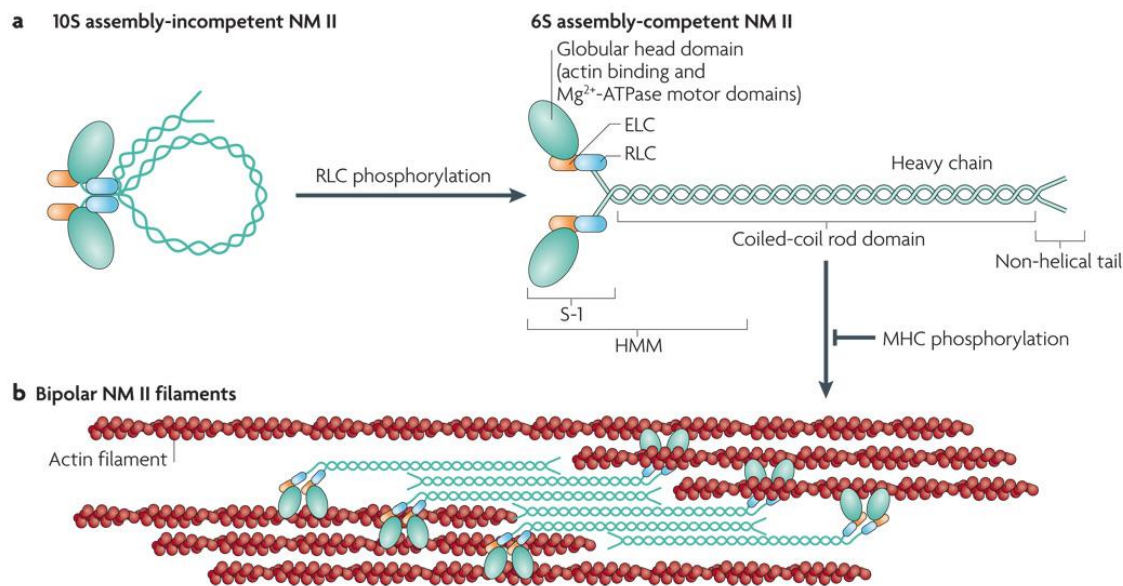


Figura I4 Estructura funcional y cambio conformacional del hexámero de miosina.

En el esquema se muestra el cambio conformacional del hexámero de miosina de una estructura de 10S inactiva, a una conformación 6S activa, por la fosforilación de residuos claves de la RLC. En la conformación activa se observan las 6 proteínas del hexámero: Las dos cadena pesadas (MHCII) con sus dominios globulares o motores, el dominio de cola súper-enrollado y la cola no helicoidal, las dos cadenas esenciales (ELC) o “álcali” y las dos cadenas reguladoras (RLC), donde se localizan los residuos que participan en el cambio conformacional. En conformación 6S, el hexámero puede formar uniones anti-paralelas con otros hexámeros de miosina e interactuar con los filamentos de actina, lo que le permite generar fuerzas mecánicas en las células.

Figura de: Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AF. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10, 778-790.

El fenómeno fisiológico que determina la capacidad de la NMII de unirse a la actina y generar la fuerza necesaria en la célula fue descrito originalmente en músculo (89) y posteriormente traducido a modelos no musculares por Spudich (93). Este modelo se denomina de puente basculante (“cross-bridge”), para representar la unión transitoria de la miosina a la actina mediada por la hidrólisis de ATP. Este ciclo genera la de la mayor parte de fuerzas mecánicas celulares y está altamente conservado en las diferentes proteínas de la familia. Las diferencias en los parámetros cinéticos confieren a las diferentes miosinas sus propiedades enzimáticas particulares. Los parálogos de la NMII muestran ligeras diferencias en sus constantes de afinidad por el ATP/ADP que son las que determinan a su vez la relación de trabajo (tiempo de unión del parálogo a la actina durante un ciclo de hidrólisis de ATP) y la velocidad de deslizamiento del filamento de actina de

cada isoforma. En este modelo, el filamento de NMII unido a una molécula de ATP está libre en el citoplasma sin formar ningún tipo de asociación con la actina, esto ocurre debido a que el sitio de unión de la miosina por la actina está dividido por una hendidura característica que le hace presentar muy baja afinidad por esta molécula impidiendo por tanto al unión en esta conformación. La hidrólisis del ATP unido a la NMII es un proceso dependiente de Mg^{2+} regulado por la actina; la hidrólisis cataliza el paso $ATP \rightarrow ADP + Pi$. Este estado intermedio cierra la hendidura del sitio de unión a la actina de la molécula de NMII, promoviendo la adquisición de una conformación de alta afinidad por el filamento de actina. Así, la NMII se une al filamento de actina. Esta unión cataliza la liberación del fosfato (Pi), que a su vez promueve un movimiento conformacional en la región de unión del ATP que se amplifica gracias al dominio “cuello” de la NMII (“*power stroke*”, en inglés). Dado que la NMII está unida a la actina durante esta parte del proceso, el cambio conformacional desplaza el filamento de actina, mientras que la NMII mantiene su posición. Una vez liberado el fosfato, el ADP tiene poca afinidad por el sitio de unión de nucleótido, favoreciéndose el intercambio con otra molécula de ATP. El intercambio de ADP por ATP abre de nuevo la hendidura, comenzando el ciclo de nuevo. Uno de los elementos claves del ciclo es el tiempo que permanece la miosina unida al filamento de actina, lo cual nos indicará la capacidad de trabajo que produce la actina en la célula. Esta variable del ciclo se denomina relación de trabajo y es específico de cada molécula. El trabajo mecánico generado por la NMII a nivel celular es causado por el movimiento concertado de muchos haces de filamentos de actina impulsados por múltiples filamentos de NMII.

Figura I5

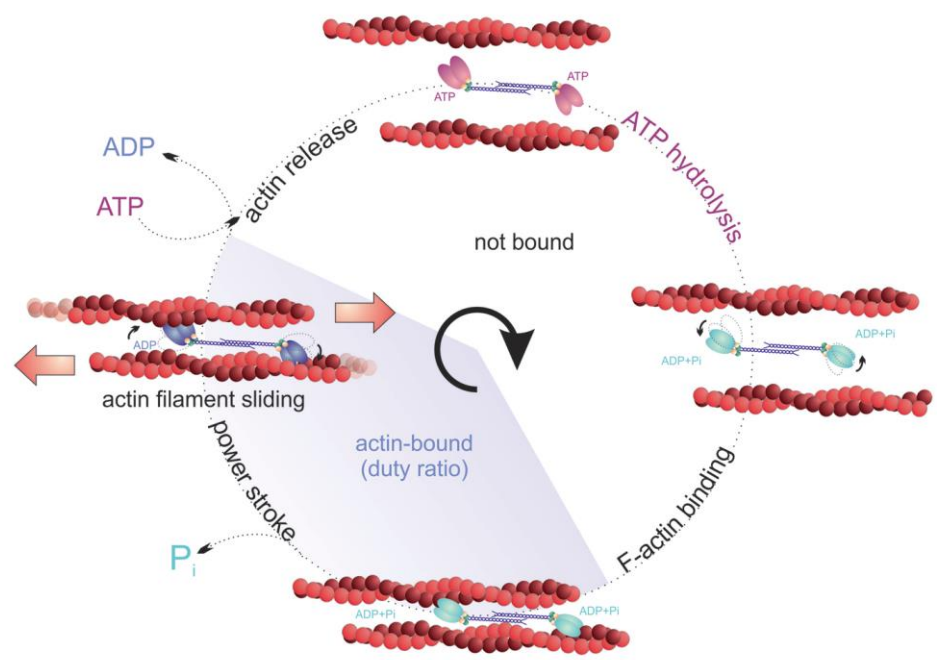


Figura I5 Ciclo de generación de fuerza mecánica de la NMII.

El esquema incluye los pasos claves en el ciclo de unión entre la miosina y la actina como se ha descrito en la sección 1.3. La cabeza de la miosina en conformación de baja afinidad por la actina se representa en violeta; alta afinidad, en azul. La relación de trabajo (“*duty ratio*”) es el tiempo en el cual la actina permanece unida a la miosina, determina la capacidad de ejercer fuerza de la proteína y es dependiente de parálogo.

Figura de: Juanes-García A, Llorente-González C and Miguel Vicente-Manzanares. Non-muscle myosin II. *Springer’s Encyclopedia of Signaling Molecules*. 2017

1.3.1 Isoformas de MHCII y parálogos de NMII.

En células de mamífero, la NMII se presenta en forma de tres parálogos principales que se diferencian tanto en su expresión en los tejidos como en sus propiedades mecanobiologicas convergentes, complementarias y no solapantes en parte debidas a su localización celular y a sus constantes de afinidad por el ATP/ADP+ Pi, como se ha visto en la sección anterior. A nivel de terminología, utilizamos “parálogo” para referirnos al complejo funcional NMII (2×MHCII+2×ELC+2×RLC), haciendo referencia a la naturaleza de su cadena pesada, que está determinada por tres genes diferentes que se generaron probablemente por duplicación ancestral (94). Por otra parte, usamos el término “isoforma” para referirnos a la cadena pesada exclusivamente. Las isoformas de cadena pesada están codificadas por en *MYH9* (cromosoma

22q12.3), *MYH10* (cromosoma 17p13.1) y *MYH14* (cromosoma 19q13.33) que codifican las cadenas MHCII-A, MHCII-B y MHCII-C, respectivamente. Se han descrito variantes de *splicing* de la cadena pesada con expresión más restringida en los diferentes tejidos (95). Existen también tres genes que codifican proteínas correspondientes a la RLC, *MYL9* (cromosoma 20q11.23), *MYL12A* (cromosoma 18p11.31) y *MYL12B* (cromosoma 18p11.31), siendo la primera una variante de músculo liso de la RLC y las dos últimas estrictamente no musculares. Por el contrario, sólo se ha descrito una isoforma para la cadena esencial, codificada por el gen *MYL6* (cromosoma 12q13.2). Las isoformas de la MHCII determinan el parólogo funcional de NMII, que denominamos respectivamente NMII-A, NMII-B o NMII-C. La eliminación específica de las cadenas pesadas MHCII produce por tanto la pérdida del parólogo funcional, y con ello las funciones celulares específicas del mismo (96). Por el contrario, la eliminación de la RLC o la ELC elimina todos los parálogos, ya que ambas proteínas son necesarias para el ensamblaje del hexámero funcional (97). En mamíferos, la expresión tisular de MHCII-A y MHCII-B es bastante ubicua (98). Existen algunos linajes, como plaquetas y eritrocitos y células musculares cardíacas adultas que no expresan NMII-B (99, 100). Por otro lado la expresión de la NMII-C es más restringida y se observa únicamente en músculo esquelético, el aparato digestivo y en órganos como el pulmón o los riñones (101).

Las isoformas de la NMII muestran constantes de afinidad ATP/ADP ligeramente diferentes que determinan su relación de trabajo y la velocidad de deslizamiento del filamento de actina. La NMII-A tiene la relación de trabajo más baja, lo que significa que esta isoforma permanece unida a la actina sólo el 5-10% del tiempo del ciclo de hidrólisis de ATP, lo que es similar a la relación observada en la miosina II muscular. Por el contrario la NMII-B tiene una relación de trabajo mayor (20-40%), permaneciendo mucho más tiempo unida al filamento de actina, lo cual permite a la actina generar trabajo durante más tiempo en la célula, mientras que la relación de trabajo de NMII-C es intermedia entre NMII-A y NMII-B (102). Los ensayos de motilidad *in vitro* han demostrado que NMII-A mueve filamentos de actina 2-3 veces más rápido que NMII-B o NMII-C (103). Estos parámetros son los que determinan las funciones celulares de las isoformas. De acuerdo con esto, la NMII-A es una isoforma “rápida”, que genera fuerza para promover el ensamblaje de nuevas fibras de actina, o en procesos dinámicos. Por el contrario, NMII-B es más “estructural”, ya que su dinámica lenta es más adecuada para soportar tensión (104).

Las funciones solapantes y específicas de la NMII-A y NMII-B han sido estudiadas mediante diversas aproximaciones, incluyendo organismos genéticamente modificados, siRNA y diversos mutantes de delección y función. La delección sistémica de MHCII-A causa defectos tempranos en la generación del endodermo visceral (105) debido a su papel crucial en la formación de los contactos intercelulares. A nivel celular, el uso de siRNA y shRNA ha revelado la función de este parólogo en el mantenimiento de la coherencia celular (106), la retracción del polo posterior durante la migración mesenquimal (96), la formación de los contactos adhesivos de las células con la matriz extracelular (107) y el mantenimiento de los contactos célula-célula mediados por cadherinas (108). En linfocitos T, el uso de animales en los que se ha delecionado específicamente MHCII-A reveló el papel esencial de este parólogo en la migración transendotelial (109) e intranodal (110). Sin embargo, su papel en la activación de los linfocitos T durante la formación de la sinapsis inmunológica es controvertido, con evidencias a favor de su papel en el agrupamiento de los complejos de señalización TCR/CD3 (47); pero también en contra (110, 111).

Por su parte, los ratones deficientes en NMII-B se desarrollan algo más que los MHCII-A^{-/-}, pero mueren en fase embrionaria tardía debido a hemorragias internas por un mal desarrollo del corazón, incluidos defectos en la formación de los septos cardíacos y posicionamiento anormal de las válvulas cardíacas (100). Estos ratones además tienen defectos en el desarrollo del cerebro, padecen hidrocefalia y son de menor tamaño que los animales control (112). Parte de estos defectos son corregidos por un mutante de MHCII-B que no genera contracción (113). Estudios usando fibroblastos de los embriones MHCII-B^{-/-} y siRNA han revelado que, a nivel celular, NMII-B es necesaria para la orientación de la protrusión (114) determinando la posición del polo posterior (115); promueve la reorganización de la matriz extracelular a través de la generación de contactos adhesivos estables (116); media los procesos de durotaxis (117) y determina la longitud y funcionalidad de las espinas dendríticas durante la sinaptogénesis del hipocampo embrionario (118).

Finalmente, la delección genética de NMII-C causa defectos en la cariocinesis de los mioblastos cardíacos sólo si también se reduce la cantidad de MHCII-B (119), y parece controlar la migración de algunos tipos de neuroblastos (120).

1.3.2 Regulación de la Miosina.

La NMII está regulada fundamentalmente a dos niveles: 1) Control de la actividad de la actividad ATPasa del dominio globular, que controla su unión a la actina y el cambio conformacional; 2) Regulación del ensamblaje de mini-filamentos. La regulación de la actividad enzimática de la proteína esta mediada principalmente por la fosforilación de varios residuos claves de Ser y Thr en la RLC. El principal es Ser19 de la RLC, que controla el cambio conformacional de la estructura 10S a la 6S (91). Además, dicha fosforilación tiene la capacidad de modificar la afinidad de la NMII por el ATP (121), es decir que regula la relación de trabajo de la NMII. Por su parte, Thr18 es un residuo que incrementa aún más la actividad ATPasa de la miosina en sinergia con la fosforilación de Ser19 (122). Existen diferentes quinasas que pueden fosforilar los residuos claves de la RLC. Thr18 y Ser19 se fosforilan principalmente por quinasas que dependen de RhoA, una GTPasa que activa a la quinasa ROCK (RhO-associated Coiled-coil Kinase). ROCK fosforila directamente el residuo activador Ser19 (123) y además inactiva a la fosfatasa específica de miosina MYPT1 (124). Otra de las moléculas de la familia Rho que participa en la regulación de la NMII es Cdc42, que activa a la quinasa MRCK (Myotonic dystrophy-Related Coiled-Coil Kinase), que fosforila RLC en Thr18 y Ser19 (125). La NMII también está regulada por el Ca^{+} citoplasmático a través de la quinasa MLCK (Myosin Light Chain Kinase). Esta quinasa se activa a través de su unión a Calcio y fosforila preferencialmente el residuo Ser19 (120). La fosforilación de los residuo Ser1 y Ser2 de la cadena ligera esta mediado por proteínas de la familia proteína quinasa C (PKC). Su efecto principal en el hexámero es el de disminuir la afinidad de la NMII por la actina, inhibiendo por tanto la capacidad de la molécula de generar fuerza en la célula (126, 127).

La interacción entre los hexámeros de NMII para formar filamentos anti-paralelos de NMII se basa en interacciones electrostáticas intermoleculares entre residuos cargados negativamente y positivamente que residen en la región C- terminal de MHCII. Es importante destacar que esta región contiene a su vez la mayoría de los residuos reguladores que subyacen a la especificidad isoforma, promoviendo así las interacciones homotípicas. Varias quinasas pueden regular la interacción entre los filamentos, incluyendo TRPM -6 y -7, miembros de la familia proteína quinasa C y CK2 (caseína quinasa 2). TRPM7 también regula la actividad de la NMII a través de la regulación de la homeostasis del Mg^{2+} en la célula (53). Otros reguladores del ensamblaje de NMII incluyen varias isoformas de tropomiosina, así como Lgl, que es una

proteína supresora de tumores que interactúa con el segmento C-terminal de MHCII-A y -B y que inhibe el ensamblaje de NMII-A *in vivo* (128).

Figura I6

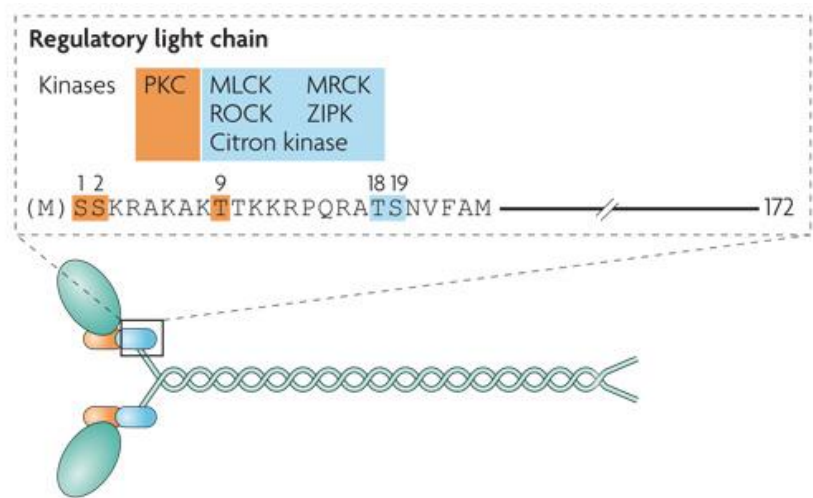


Figura I6 Residuos claves de la RLC de la Miosina no Muscular.

El esquema representa los residuos claves en la activación del hexámero de miosina, Ser19 y Thr18, fosforilados por diferentes quinasas como MLCK, ROCK y otras. Esta regulación es independiente de parálogo, ya que depende en exclusiva de la cadena reguladora, que es común. La fosforilación en Ser19 favorece la conformación abierta o activa del parálogo. Además, esta fosforilación también incrementa la actividad ATPasa de la cadena pesada a la que está unida, por lo que aumenta su capacidad de ejercer su función en la célula. Las fosforilaciones en los residuos reguladores Ser1 y Ser2 son inducidas por PKC. Estas fosforilaciones disminuyen la capacidad ATPasa del parálogo inhibiendo por tanto la capacidad de la molécula de generar fuerza en la célula.

Figura de: Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AF. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10, 778-790.

2. Objetivos:

La función de la NMII-B en la generación de tensión intracelular y su papel crucial en la citoarquitectura de las células mesenquimales nos permite proponer que la NMII-B controla la polaridad intrínseca de los linfocitos T en el contexto de la migración celular y la activación mediada por contactos sinápticos polarizados.

De acuerdo a nuestra hipótesis, los objetivos específicos de este trabajo de Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) Analizar la expresión y la localización celular de NMII-B en células del linaje linfoide sometidas a diversos tipos de estimulación.
- 2) Determinar el papel de NMII-B en la polaridad y en la capacidad de migración a través de membranas semipermeables de los linfocitos T.
- 3) Analizar el papel de la NMII-B en la arquitectura del linfocito T durante la sinapsis inmune.
- 4) Determinar si la NMII-B controla la activación de los linfocitos T.

3. Material y Métodos

3.1 Células:

En este trabajo, se han usado las siguientes líneas celulares:

Obtenidas de DSMZ (Braunschweig, Alemania):

- Jurkat, linfoblástica T (*Homo sapiens*) y su sub-clon J77 Cl20 (Val.2 Vβ8+ TCR), descrito en (129).
- Raji (ACC-319), linfoblástica B (*Homo sapiens*) derivada de un linfoma de Burkitt.
- Granta-519 (ACC 342), linfoblástica B (*Homo sapiens*) derivada de un linfoma B.
- Peer (ACC 6), linfoblástica T (γδ) (*Homo sapiens*) derivada de una leucemia T.

Obtenidas de ATCC (Manassas, USA):

- CCRF-CEM, linfoblástica T (*Homo sapiens*) (CCL-119).
- EL-4, linfoblástica T (*Mus musculus*) (TIB-39).
- B16-F10, melanoma (*Mus musculus*) (ATCC CRL-6322).
- COS-7, epitelio renal (*Chlorocebus aethiops*) (ATCC CRL-1651).
- CHO.K1, epitelio (*Cricetulus griseus*) (ATCC CCL-61).

Todas las células se cultivaron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640+GlutaMAX–I+25 mM HEPES de Gibco–Invitrogen (Carlsbad, USA), suplementado con 10% con suero fetal bovino de GE Healthcare, Life Sciences, Hyclone, (Logan, USA), penicilina 100 µg/ml, estreptomicina 50 µg/ml y aminoácidos no esenciales; excepto las B16-F10, COS-7 y CHO.K1, que se cultivaron en DMEM (modificación de medio Basal Medium Eagle), glucosa 4.5g/dl para las B16 y COS7; 1 g/dl para las CHO.K1, de Gibco, suplementado con suero fetal bovino de GE Healthcare HyClone (Pittsburgh, USA) al 10%, penicilina 100 IU ml⁻¹ estreptomicina 50 µg/ml (Gibco) y aminoácidos no esenciales (NE-AA, Gibco). Se comprobó la expresión de CD (*cluster de diferenciación*) típicos de linaje (CD3 para las líneas T; CD20 para las B) con anticuerpos específicos mediante citometría de flujo. Las células sanguíneas humanas mononucleares (PBMCs) se aislaron de buffy coats obtenidos de donantes sanos del Centro

Nacional de Transfusiones por gradiente de Biocoll de Biochrom, (Cambourne, UK) de acuerdo con procedimientos estándar. Los monocitos fueron separados del total de los PBMCs mediante adhesión a placa a 37°C en el medio anteriormente descrito, para generar un cultivo de linfocitos de sangre periférica (PBLs). Las células no adherentes fueron lavadas de la placa. Cuando se indica, los linfocitos T CD4⁺ fueron purificados mediante selección negativa con esferas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos de linaje de la empresa MACS; Miltenyi Biotech (Gladbach, Alemania). Para generar los linfoblastos T humanos, los PBLs fueron cultivados durante dos días en presencia de fitohemaglutinina-L (PHA-L, 1 µg/ml) de Sigma Aldrich (Nº Cat. 11249738001 Roche St. Louis, USA) o utilizando una combinación de anticuerpo anti-CD3 OKT3, de Biolegend (Cat. No. 317301, San Diego, USA) y anti-CD28 de Biolegend (CD28.2, Cat. No. 302902) a 10 µg/ml and 5 µg/ml, respectivamente. A los 2-3 días, se retiró la PHA-L y se añadió al cultivo Interleuquina-2 (IL-2, 100 U·ml⁻¹) donado por el NIH AIDS reagent program (Bethesda, USA). La IL-2 se sustituyó cada dos días y los cultivos se mantuvieron durante un total de 7 días (dos días con PHA-L y cinco días con IL-2). Estos estudios se han realizado de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki y aprobados por el comité ético para la investigación básica del Hospital La Princesa (Madrid); así mismo, se obtuvieron los consentimientos informados de los diferentes voluntarios humanos siempre que fue necesario. Los linfocitos T de ratón de la cepa C57/BL6 utilizados en la presente Tesis doctoral fueron suministrados por el grupo de investigación de la doctora María N. Navarro, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid).

3.2 Anticuerpos y Reactivos:

Se utilizaron anticuerpos contra las siguientes moléculas (se indica el antígeno, casa comercial, número de catálogo, tipo de anfitrión e isotipo del anticuerpo, si procede, y la dilución de uso.

Tabla M1: Anticuerpos usados en este estudio.

Nombre	Marca comercial	Referencia	Especificidad	Marcaje	Dilución utilizada		
					WB	IF	FCS
Miosina IIA	Biolegend	909801	pAb conejo	ninguno	1/5000	1/1250	1/1000-1/2000
Miosina IIB	Biolegend	909901	pAb conejo	ninguno	1/5000	1/1250	1/1000-1/2000
Miosina IIA (2F2)	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire	-	mAb ratón	ninguno		Sobre nadante (1/1)	suero (1/1)
CD3 (OKT3)	Biolegend	317301	mAb ratón IgG2ae	ninguno	-	1/100	1/200
CD28.2	Biolegend	102101	mAb ratón IgG1	ninguno	-	-	1/200
Vimentina (vim-13.2)	Sigma-Aldrich	V5255	mAb ratón IgG1	ninguno	1/1000	-	-
GAPDH	Biolegend	649202	mAb ratón IgG1	ninguno	-	-	1/200
Talina 1	Abcam	ab57758	mAb ratonIgG3	ninguno	-	1/200	-
α-Tubulina (DM1A)	Millipore	T9026	mAb ratón IgG1	ninguno	1/1000	-	-
PKC ζ	Santa Cruz	sc-216-G	pAb cabra	ninguno	1/1000	-	-
ICAM3	Referencia (130)	HP2/19	mAb ratón	ninguno	-	suero (1/1)	-
CD18(β2)	Referencia (131)	Lia (3/2)	mAb ratón	ninguno	-	suero (1/1)	-
CD69	Biolegend	310924	mAb ratón	biotinilado	-	-	1/200
CD20	BD	302320	mAb IgG2bk	APC-H7	-	-	1/50
Anti- CD4 (humano)	BD	560158	mAb ratón IgG1	APC-H7	-	-	1/50
Anti- CD25 Clone 2A3 (humano)	BD	347643	mAb ratón IgG1	FITC	-	-	1/50
Anti- CD3 (humano)	BD	340661	mAb ratón IgG1	APC	-	-	1/50

Anti- CD4 (humano)	BD	340672	mAb ratón IgG1mouse	APC	-	-	1/50
Anti- CD8 (humano)	BD	340584	mAb ratón IgG1	APC	-	-	1/50
Anti- CD14 (humano)	BD	340436	mAb ratón IgG2b	APC	-	-	1/50
Anti- CD19 (humano)	BD	340722	mAb ratón IgG1	APC	-	-	1/50
Anti- CD45RO (humano)	BD	560608	mAb ratón IgG2a	Pe-Cy7-A	-	-	1/50
Anti- CD45RA (humano)	Biolegend	304123	mAb ratón IgG2b	Pacific Blue	-	-	1/50
Anti-CD4 (humano)	BD	560158	mAb ratón IgG1	APC-H7	-	-	1/50
Anti-CD3ε (ratón)	Tonbo Bioscience	145-2C11	mAb hámster armenio IgG	-	-	-	-
Anti-CD28 (ratón)	Tonbo Bioscience	40-0281	mAb hámster sirio dorado IgG	-	-	-	-
Anti-CD4 (ratón)	Tonbo Bioscience	60-0042	mAb rata IgG2a, kappa	Pe-Cy7	-	-	1/200
Anti-CD8 (ratón)	Tonbo Bioscience	65-0081	mAb, rata IgG2a, kappa	PerCP	-	-	1/200
Anti-CD25 (ratón)	Tonbo Bioscience	20-0251	mAb rata IgG1, lambda	APC	-	-	1/200
Anti-CD44 (ratón)	Tonbo Bioscience	25-0441	mAb rata IgG2b, kappa	APC-H7	-	-	1/200
Anti-CD3ζ Y83	Abcam	ab68236	mAb conejo IgG	-	1/5000	-	-
Anti-phospho- Erk1/2 (Thr202/Tyr204 Antibody, Thr185/Tyr187)	Calbiochem/Merck- Millipore	05-797R	mAb conejo IgGt	-	1/5000	-	-
anti-PLCγ1 Y783	Cell Signalling	#2821	pAb conejo	-	1/1000	-	-
PLCγ1	Cell Signalling	#2822	pAb conejo	-	1/1000	-	-
Anti-CD3ζ	Referencia (132)	-	-	-	1/5000	-	-

Para la realización de dobles tinciones, se obtuvo un anticuerpo monoclonal murino (clon 2F2) que reconocía específicamente MHCII-A. El anticuerpo, generado por la Dra. Valeria Pavet-Portal en el Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Estrasburgo, Francia), se obtuvo por inmunización con el péptido específico de MHCII-A C-LAAENRLTEMETLQ (amino ácidos 862-875), que presenta un 70% de divergencia entre MHCII-A y MHCII-B. El péptido se conjugó a KLH y se realizaron 4 inmunizaciones (inicialmente, 50 µg con adyuvante de Freund completo; 2ª y 3ª

inmunización, 30 µg a día 10 y 20 en adyuvante incompleto, y la última a día 30 con 60 µg en adyuvante incompleto). Las células productoras de anticuerpo fueron fusionadas cuatro días después de la última inmunización con células de mieloma P3X63 para obtener hibridomas inmortalizados. El *screening* inicial de los sobrenadantes se realizó en el laboratorio original (IGMCB, Estrasburgo) por ELISA usando el péptido usado para inmunizar, inmovilizado en placas de 96 pocillos. De aquí se seleccionaron seis clones, del cual se eligió el clon 2F2 para los experimentos realizados en este trabajo. Como parte del trabajo de esta Tesis Doctoral se ha comprobado la especificidad y ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo contra las otras isoformas de MHCII. El anticuerpo reconoce una única banda al esperado peso molecular de 220 kDa que corresponde con el peso estimado de la cadena pesada de la miosina no muscular en la línea celular B16.F10, que expresa MHCII-A, pero no MHCII-B (115), pero no en la línea celular COS7 (que expresa MHCII-B, pero no MHCII-A) (115) (**Fig. R9A**). La especificidad del anticuerpo se verificó en experimentos de sobre-expresión, en los que observamos que el anticuerpo reconocía la GFP-MHCII-A sobre-expresada, pero no GFP-MHCII-B (**Fig. R9B**).

3.3 Otros reactivos:

Para la realización de experimentos de microscopía, se utilizaron los fluorocromos vitales CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin; C2110, 0.1 µM) de Thermo Fisher Scientific (USA), CFSE (2,5-Pyrrolidinedione, 1-[[[3',6'-bis(acetyloxy)-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-5(o 6-yl)carbonyl]oxy]-150347-59-4) de Thermo Fisher Scientific (USA) a una concentración final de 1 µg/ml y el marcador nuclear Hoechst (33258 2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-23491-52-3) de Thermo Fisher Scientific (USA) a una concentración de uso de 100mM. En los ensayos de activación celular se utilizó la enterotoxina E (SEE; 0.3 µg/ml) de *Staphylococcus aureus* ET404 de Toxin Technologies (Sarasota, USA). Los inhibidores de MEK1 PD98059 (HY-12028) y PD184352 (HY-50295) de Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA). El montaje de los cubres de inmunofluorescencia (Borosilicato de 13 mm (Cat. No. 631.0150) y 25 mm de diámetro (Nº Cat. 631-0171), glass type 1, de VWR) se realizó con Mowiol 488 (Nº Cat. 475904) de Merck-Millipore. En los ensayos de adhesión se utilizó fibronectina (F2006) (25 µg/ml diluida en HBSS) y poli-L-Lys (P8920) (50 µg/ml diluida en tampón borato) ambas de Sigma-Aldrich (USA), y también ICAM-1 recombinante (ADP4-050) (2 ug/ml en HBSS) de R&D Systems (USA).

3.4 Anticuerpos secundarios para Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo:

Para la identificación específica de los filamentos de actina por citometría o microscopía se utilizó faloidina conjugada con Alexa Fluor 647 (A-22287; IF 1/200). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: cabra anti-conejo y cabra anti-ratón, purificados para evitar reconocimiento cruzado, conjugados a Alexa Fluor 488 (A-11034 y A-11029, respectivamente; FC/IF 1/200), Alexa Fluor 568 (A11036 and A-11031, respectivamente; IF 1/200) y Alexa Fluor 647 (A-21443 y A-21236, respectivamente; FC/IF 1/200).

3.5 Plásmidos y siRNAs, transfección celular:

Los plásmidos codificantes para GFP-MHCII-A y GFP-MHCII-B han sido descritos en (96). Las construcciones originales fueron generosamente donadas por el Prof. R.S. Adelstein (NIH Laboratory of Molecular Cardiology, Bethesda, MD). El plásmido conteniendo GFP-Vav1 fue donado generosamente por el Prof. Xosé Bustelo (CIC, Salamanca) y el que contenía CD3ζ-GFP fue un regalo del Prof. Balbino Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). Los linfocitos T aislados de sangre periférica y la línea celular Jurkat fueron transfectados con el RNA de interferencia (siRNA) contra la miosina IIA humana (Myh9), secuencia 5'-GTATCAATGTGACCGATTTdTdT-3' y la miosina IIB (gen Myh10) (5'-GGAUCGCUACUAUUCAGGGAdTdT-3'). Como control negativo, se usó una secuencia sintética con baja homología en el transcriptoma humano (5'-CGUACGCGGAUACUUCGAdTdT-3'). Los siRNA fueron comprados a Eurogentech (Lieja, Bélgica). Para la transfección, las células (10^7) fueron centrifugadas a 1,200 rpm durante 5 min y resuspendidas en 10 ml de Hank's balance salt solution (HBSS) de Lonza (Basilea, Suiza). Este proceso se repitió dos veces. Al final, las células se resuspendieron en 400 µl Opti-Mem I de Gibco-Invitrogen. Los plásmidos correspondientes (10 µg por condición) o el siRNA (10 µg por condición) se mezclaron con las células en cubetas de electroporación de 0.4 cm de BioRad (Nº Cat. 1652088, USA) y se sometieron a electroporación en un dispositivo Gene Pulser II de BioRad. Las condiciones de electroporación fueron: 240 V, 975 mΩ, ~25 ms. Inmediatamente después de la electroporación, las células se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo. Las células primarias CD4⁺ T fueron transfectadas por el mismo protocolo 48 horas después de añadir PHA-L en el medio de cultivo.

La IL-2 se añadió inmediatamente después de la trasfección. Los experimentos se realizaron a las 72h de la trasfección.

3.6 Citometría de Flujo:

El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto™ II de Beckton-Dickinson. La selección de poblaciones hematológicas tanto humanas como murinas y el análisis de expresión de marcadores específicos de linaje se realizaron mediante el BD FACSDIVA™ SOFTWARE y el software de análisis Cyflogic Version 1.2.1 de Cyflo Ltd (Turku, Finland).

3.7 Activación de PBL y células T para la medida de expresión de NMII por inmunoblot y citometría de Flujo:

Para la activación de los linfocitos T humanos, las células se incubaron inicialmente con PHA-L (1 µg/ml) durante dos días. Posteriormente, las células se lavaron y se les añadió IL-2 (50 U/ml) en medio fresco. La IL-2 se renovó a las 48h y las células se mantuvieron en cultivo un total de 7 días. Para la estimulación dependiente de TCR/CD3, los linfocitos T humanos fueron incubados durante los tiempos indicados con el anticuerpo OKT3 (10 µg/ml) y el anticuerpo CD28.2 (5 µg/ml). En ensayos de estimulación por formación de SI, las células Raji fueron pre-incubadas con 0.3 µg/ml de enterotoxina E (SEE) (30 min), y luego mezcladas con células Jurkat en una proporción 1:5. Las células fueron centrifugadas a baja velocidad (900 rpm) e incubadas en tubos cónicos de 1.5ml a 37°C y 5 % de CO₂ para favorecer la formación de conjugados.

3.8 Conjugados celulares para análisis de Sinapsis Inmune mediante citometría de flujo y microscopia de fluorescencia y Confocal:

Las células Raji, usadas como células presentadoras de antígeno (CPA) se lavaron con HBSS, se tiñeron con CMAC (10 µM), únicamente para los ensayos de microscopia, y se cargaron con SEE durante 30 min a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente las células T (2.5×10⁵) células por condición) se mezclaran en una proporción (1:1) con las células Raji en cubres recubiertos con poly-L-Lys- (50 µg/ml; 1 h a 37 °C) o fibronectina (20 µg/ml. 2 h a 37 °C), o en tubos cónicos de 15 mililitros de Corning, (New York, USA), a un volumen final de 2 ml en medio RPMI durante 24 horas. Las células se incubaron durante 30 min a

37 °C y se fijaron con paraformaldehído, de ThermoScientific, (N° Cat. 28908, USA) al 4% diluido en PBS. Posteriormente, se permeabilizaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución de permeabilización se utilizó 0.5% de Triton X-100, (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol solution) de Sigma-Aldrich (N° Cat. 93443). Las células fijadas y permeabilizadas para microscopia fueron tratadas con un tampón citoprotector para inmunofluorescencia (PHEM pH 6.9, conteniendo 60 mM PIPES, 25mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2% BSA + 50 µg/ml gamma-globulina humana + 0.05% acida) durante 30 min y teñidas con los anticuerpos primarios indicados, seguidos por los anticuerpos secundarios Alexa Fluóor-488, -568 ó -647, en presencia, o no, de faloidina conjugada con Alexa Fluor 488, 568 o 647, como se indica en cada caso. Las preparaciones de microscopia fueron montadas con el medio de montaje Mowiol. Las imágenes de microscopia fueron procesadas y analizadas usando el software ImageJ 1.47t del NIH (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) o analizadas por citometría de flujo véase punto 3.6.

3.9 Ensayos de migración en cámaras de Boyden modificadas (Transwell):

Para los ensayos de migración y extravasación de los linfocitos humanos de sangre periférica se pre-activaron las células T con PHA-L e IL-2 como se ha indicado, y se transfectaron con siRNA específicos de doble cadena contra *Myh9* (MHCII-A) o *Myh10* (MHCII-B). A día 3 de su activación, las células se usaron en experimentos de migración en cámaras modificadas de Boyden (3.0 µm de tamaño de poro) de Corning, (New york, USA) durante 12 horas. Como quimioatrayente, se utilizó la quimiocina CXCL12 o SDF-1α, Cat. 300-28A, Peprotech (London, UK) a una concentración final 25 nM en la cámara inferior. El porcentaje de células migratorias se calculó en muestras triplicadas en un Clitómetro de Flujo FACSCanto™ II y referidos a controles en los que se considera el total de células por punto (100%).

3.10. Análisis de polarización celular en linfocitos T:

Para el ensayo de polarización se utilizaron linfocitos humanos de sangre periférica, se trataron PBLs con el tratamiento anteriormente citado en los ensayos de migración. Las células en las que se inhibió la expresión de MHCII-A o MHCII-B mediante siRNA específicos con la condición de siRNA como trasfección sin efecto de silenciamiento específico y se adhirieron a cubreobjetos de 13 o 25 mm recubiertos con una solución con fibronectina (20 µg/ml) en medio RPMI durante 3 horas a 37°C y 5% de

CO₂ y fijadas con paraformaldehído al 4%. Las células se tiñeron con anticuerpos específicos contra MHCII-B, MHCII-A e ICAM-3 más el colorante nuclear Hoechst. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DMR8000 con un objetivo de inmersión 63 × NA1.30. Las preparaciones fueron montadas con el medio de montaje Mowiol. Las imágenes de microscopia fueron procesadas y analizadas usando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). El índice de polaridad fue calculado utilizando como la longitud del eje mayor de la elipse que mejor define la forma de la célula dividida por el eje menor pasando por el centro del núcleo.

3.11. Microscopia Confocal y TIRF:

Para adquirir las imágenes *in vivo* y de células fijadas se utilizó un microscopio Confocal (SP5, Leica). Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo Plan Apochromat 63× (NA 1.40) por iluminación con luz de la longitud de onda apropiada de un láser Ar de 488 nm (los fluorocromos utilizados con este láser son GFP y Alexa Fluor 488), diodo-61nm (los fluorocromos usados con este láser son mCherry, Alexa Fluor 568 y RhodaminaX), o un láser He/Ne de 633 nm (el fluorocromo usado con este láser es Alexa Fluor 647) usando un filtro espectral e híbrido (HyD; Leica). Las imágenes fueron recogidas utilizando el software TCS (Leica) y posteriormente analizadas a través del software de análisis ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para la adquisición de imágenes en vivo, las células se mantuvieron en su propio medio de cultivo RPMI y se utilizó una incubadora para generar una atmosfera a 37° y 5% de CO₂. Para la adquisición de las imágenes de los conjugados B-T se sembraron 2×10⁵ células Jurkat transfectadas con los plásmidos o siRNA indicados sobre cristales de 25 mm recubiertos con fibronectina (20 µg/ml) en una cámara abierta Attofluor, para posteriormente añadir células Raji (5×10⁵ por condición) pre-activadas con SEE y marcadas con CMAC.

Las imágenes de reflexión se obtuvieron en un microscopio invertido automatizado (IX83, Olympus) equipado con un objetivo 60× Apochromat N OTIRF (NA 1.49), una unidad TIRF Mítico (Olympus) y líneas láser de 491/561 nm. Las muestras con dos fluorocromos (GFP-mCherry o equivalente) se visualizaron con un filtro de emisión dual (Z488 / 561). Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara CCD de multiplicación de electrones (ImagEM X2, Hamamatsu Photonics) y el software Xcellence (Olympus). En todos los casos, las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. Las imágenes

se analizaron utilizando ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). En los ensayos de adhesión y adecuación celular al sustrato las células T, transfectadas para CD3ζ-GFP, y mCherry-MHCII-B, se sembraron en cristales de 25 mm (No 1.5 Mattek; Ashland, MA, US) recubiertas por anti-CD3 (10 µg/ml) y anti-CD28 (5 µg/ml), fibronectina 20 µg/ml o ICAM-1 5µg/ml para su posterior análisis por Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.12 PCR cuantitativa en tiempo real:

Para analizar a nivel de ARN la expresión de MHCII-B, producto del gen *Myh10*, se trataron PBL con PHA-L e IL-2 como se ha indicado en las secciones anteriores y se extrajo el ARN de acuerdo a protocolos estandarizados usando Trisure de Bioline (Nº Cat. BIO-38033, London, UK). El RNA se retrotranscribió con un sistema de transcripción inversa de cDNA de Applied Biosystems (Nº Cat. 4368814, California, USA). Los niveles de expresión de los mRNA *Myh9* y *Myh10* fueron determinados por PCR cuantitativa en tiempo real utilizando cebadores específicos (ver más abajo). La cantidad de ARNm fue analizada utilizando el kit GoTaq® qPCR Master Mix de Promega (Nº Cat. A6001,) en un sistema de Real-Time PCR StepOnePlus de Applied Biosystems (California, USA). Como control de gen *housekeeping* se usaron cebadores para el gen *GAPDH*. Los datos obtenidos para los ARNm de *Myh9* y *Myh10* fueron ajustados de acuerdo a la expresión relativa de los genes control utilizando para ello el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (48) . Las secuencias de los primers usados son los siguientes: *Myh9* (forward) 5'- TTG GAG AAA TCT CGT GCT ATC C-3', (reverse) 5'- ACA GGA AGC GGT ATT TGT TGT AC-3'; *Myh10* (forward) 5'-TCC TAG AAC AAG AGG AAT ACC AGC -3', (reverse) 5'-TCA TCC AAA AGG GCC AGT AC-3'; *HPRT* (forward) 5'-ATT GTA ATG ACC AGT CAA CAG GG-3', (reverse) 5'-GCA TTG TTT TGC CAG TGT CAA-3'; *GAPDH* (forward) 5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3', (reverse) 5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'.

3.13 Western Blot:

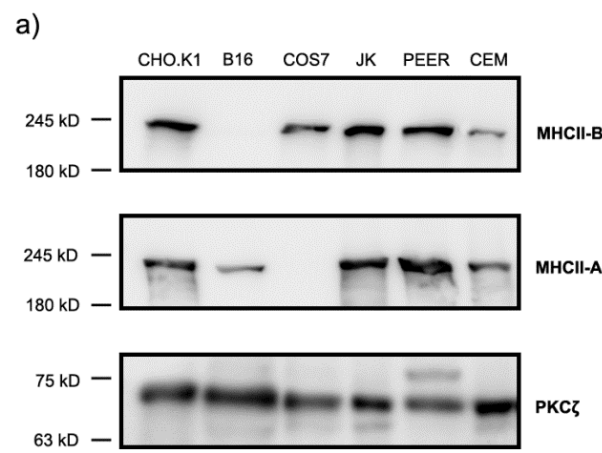
Las células fueron lisadas en buffer RIPA (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Deoxicolato sódico, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) complementado con inhibidores de proteasas (Nº Cat. P8340), y fosfatasas (Nº Cat. P2745 y P5726), de Sigma-Aldrich. Las muestras se disolvieron en el buffer RIPA y se pasaron 10 veces a través de una aguja de diámetro 25G. Se centrifugaron los lisados a 14,000 rpm (4 °C, 10 min) para eliminar restos insolubles en el detergente, incluyendo los núcleos. Los sobrenadantes se mezclaron con buffer Laemmli y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en un baño seco. Los lisados se resolvieron en geles SDS-PAGE, con una concentración del 7% de acrilamida-bisacrilamida de Applichem y trasferidas a membranas de nitrocelulosa de BioRad. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con 4% de BSA de la empresa NZYtech en TBS y 0.1% Tween-20 (TBS-T) y se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C. Tras dos lavados de 15min con TBS-T, se usaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP de Pierce–Thermofisher Scientific (anti-conejo Nº Cat. 31460, anti-ratón, Nº Cat. 31430, USA) para detección por quimioluminiscencia. Para eliminar el exceso de anticuerpo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBS-T y se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia Luminata Forte de Merck-Millipore (Nº Cat. WBLUF0100), en un sistema de foto-documentación LAS-4000 de Fuji-film.

4. Resultados

4.1 La NMII-B se expresa en linfocitos T humanos.

Para determinar la expresión de MHCII-B en linfocitos T humanos (y por tanto el parálogo NMII-B), realizamos experimentos de citometría de flujo y Western Blot de una serie de líneas celulares inmortalizadas de linfocitos T humanos incluyendo células Jurkat, CCRF-CEM y Peer, y la línea celular leucémica de origen murino EL4. Como controles de especificidad del reconocimiento mediado por anticuerpo utilizamos la línea celular COS7, que no expresa la proteína MHCII-A (el producto proteico del gen *Myh9* que determina el parálogo NMII-A) y la línea celular B16.F10, que no expresa la proteína MHCII-B (111). En las líneas linfoides humanas, se detectó una banda específica en el Western Blot de un peso molecular aproximado de 220 kD que no se detectó en el lisado de COS7 (**Fig. R1A**). El anticuerpo contra la proteína MHCII-B reconoció una proteína de un peso molecular similar al esperado (**Fig. R1A**) en todas las líneas linfoides del ensayo, pero no en las células B16.F10. Se puede afirmar por tanto que las diferentes líneas linfoides estudiadas expresan la proteína MHCII-B, y que por tanto presentan en su citoplasma el parálogo NMII-B. Además, observamos que los niveles de expresión de MHCII-B eran aparentemente más elevados en las líneas linfoides T estudiadas que en la línea linfoblástica B Raji, ya que el cociente de intensidad de fluorescencia MHCII-B / MHCIIA era mucho mayor en las células Jurkat que en las Raji (**Fig. R1B**). Finalmente se observó que la línea murina EL4, de origen linfoide T, también expresa niveles detectables de MHCII-B (**Fig. R1C**).

Figura R1



Con el objetivo de confirmar a nivel de RNA mensajero la expresión del gen *Myh10* (que codifica MHCII-B) en las diferentes líneas celulares realizamos un estudio de expresión mediante PCR semi-cuantitativa usando ADNc retrotranscrito a partir de ARN de las líneas celulares usadas anteriormente, además de la línea linfoblastoide B GrantA. De manera esperable, obtuvimos resultados positivos para *Myh10* (MHCII-B) y *Myh9* (MHCII-A) en todas las líneas celulares utilizadas. Después de referenciar los datos obtenidos a la expresión del gen de referencia (GAPDH), relativizamos los datos con respecto a los niveles de la línea Raji. Esta representación nos permitió determinar que la expresión del gen *Myh10* era mucho mayor (con respecto a GAPDH) en las líneas T evaluadas que en las células Raji, hasta quince veces; mientras que la expresión del gen *Myh9* era mucho más parecida (el doble en Raji que en Jurkat). Estos datos acerca de la expresión de *Myh10* (MHCII-B) en Jurkats respecto a los Raji correlacionan bien con los datos de proteína, siendo incluso más dramático el efecto observado por qPCR.

Figura R2

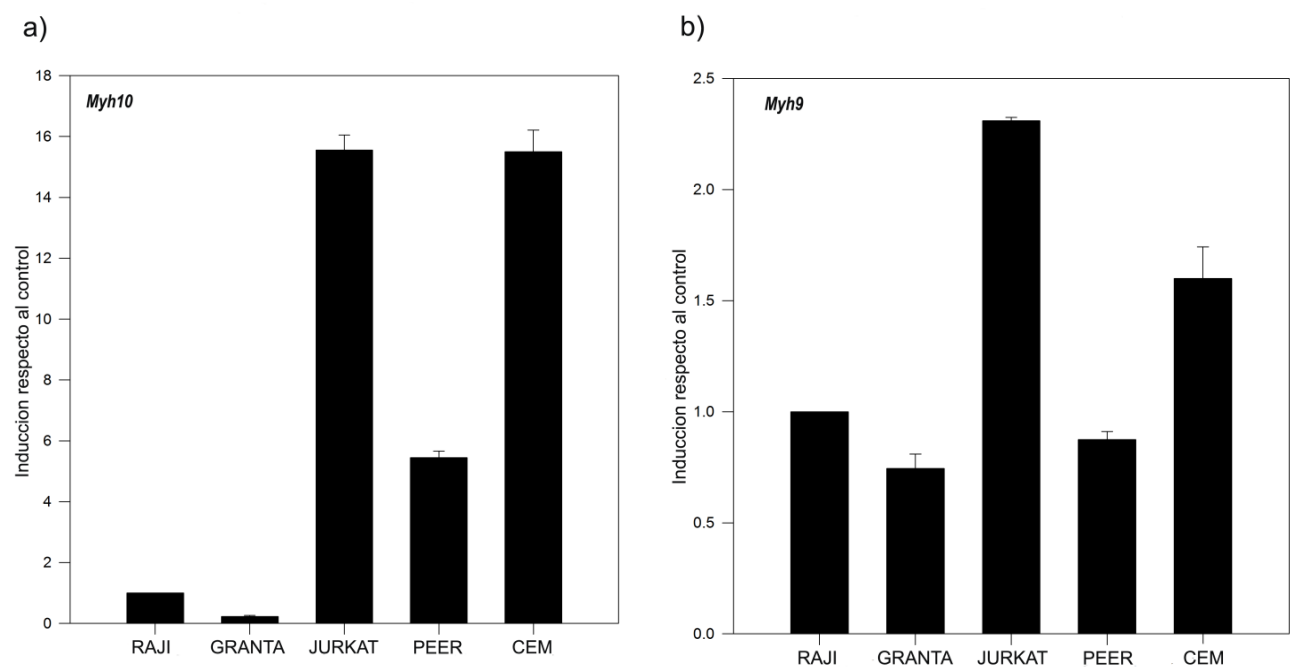


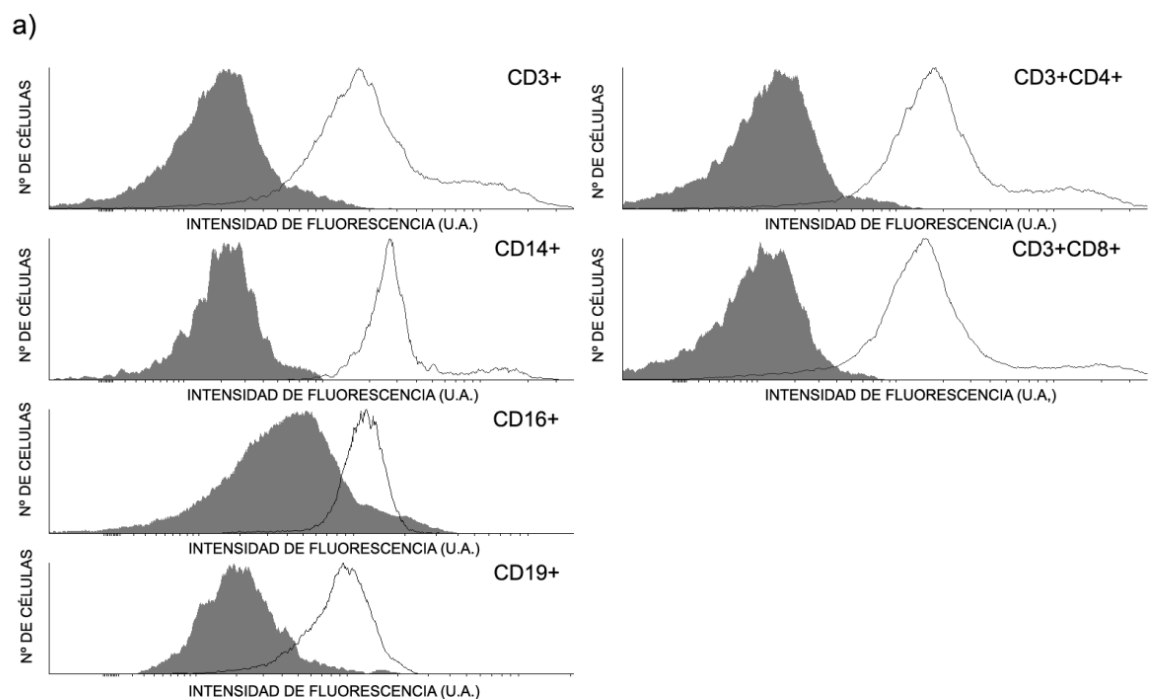
Figura R2 Expresión de *Myh9* y *Myh10* en las líneas celulares linfoides T y B.

a) Análisis por PCR semi-cuantitativa en tiempo real del gen *Myh10* en las líneas celulares Raji (utilizada para relativizar la expresión del ARN mensajero, ver texto para los detalles), Granta-519, Jurkat (J77), PEER y CCRF-CEM. Los valores están relativizados inicialmente con respecto al control de referencia GAPDH. Tanto en (a) como en (b), los datos representan la media \pm SD de dos experimentos realizados por triplicado.

b) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión del gen *Myh9* en las líneas usadas en (a).

Estos experimentos, encaminados a demostrar la expresión de MHCII-B tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína en las diferentes líneas linfoides estudiadas, nos permitieron plantearnos estudiar la expresión de esta proteína en células primarias, específicamente linfocitos T humanos. Para ello, recolectamos una serie de muestras hematológicas de diferentes donantes sanos y las examinamos por citometría de flujo (**Fig. R3**). Para determinar la expresión de MHCII-B en cada una de las diferentes poblaciones leucocitarias mayoritarias utilizamos marcadores específicos de linaje celular (CD16 para células NK; CD14 para monocitos; CD3/CD4 para para linfocitos T colaboradores; CD3/CD8 para linfocitos T citotóxicos; y CD19 para linfocitos B; los granulocitos fueron excluidos por tamaño/complejidad) (133). Todas las poblaciones leucocitarias estudiadas presentaban niveles elevados de expresión de MHCII-A (**Fig. R3B**). Por el contrario, los granulocitos eran negativos para MHCII-B, y los linfocitos B y células NK expresaban niveles muy bajos de MHCII-B. Sin embargo, los monocitos y los linfocitos T expresaban niveles más elevados de esta proteína en condiciones basales, confirmando la expresión de esta isoforma en células linfoides humanas (**Fig. R3A**). En cambio, ni los linfocitos T CD4+ murinos (**Fig. R3C**) ni los T CD8+ murinos (no se muestra) expresaban MHCII-B en condiciones basales (sin estimular).

Figura R3



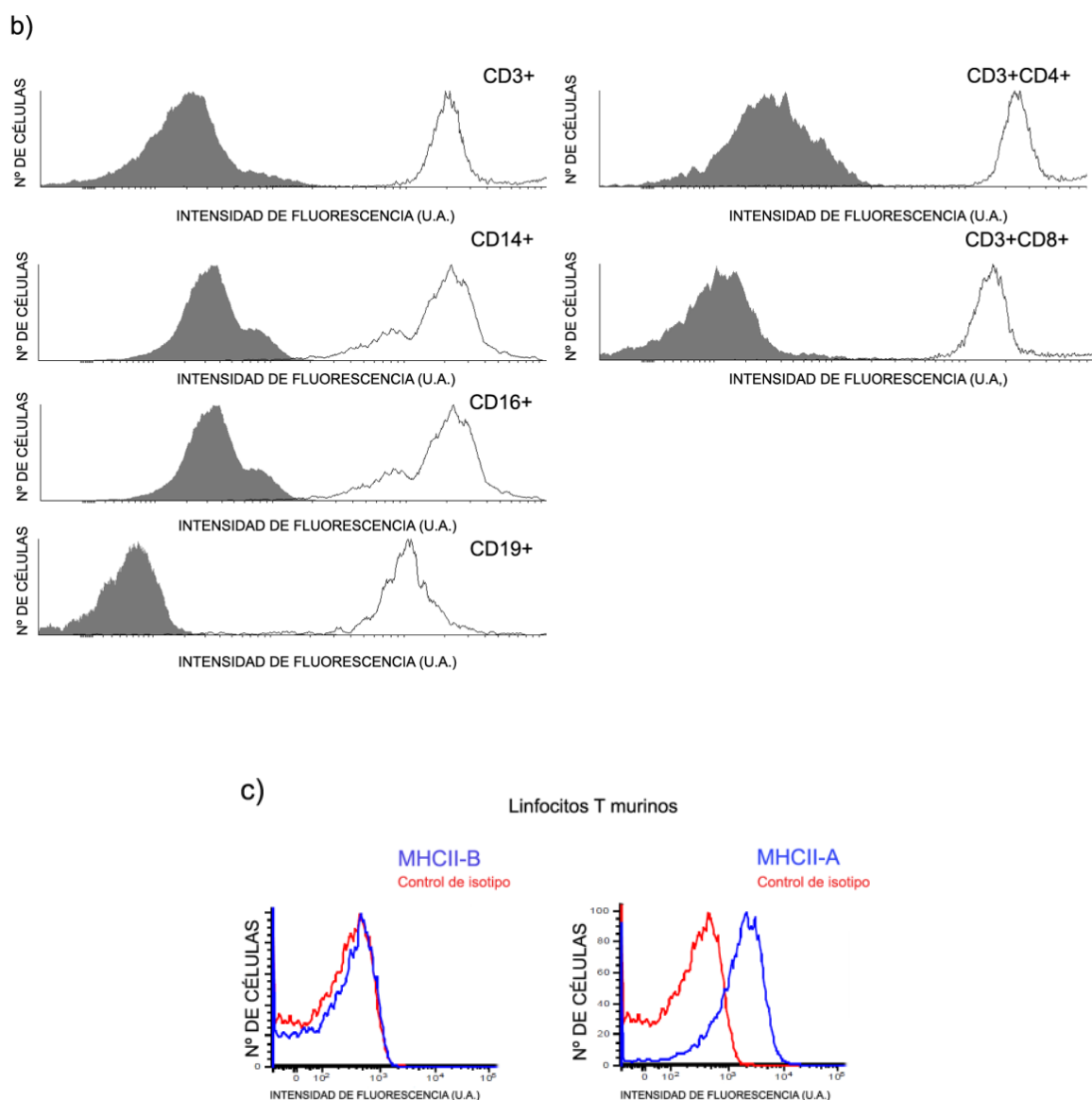


Figura R3 Expresión de MHCII-A y MHCII-B en células primarias humanas y murinas.

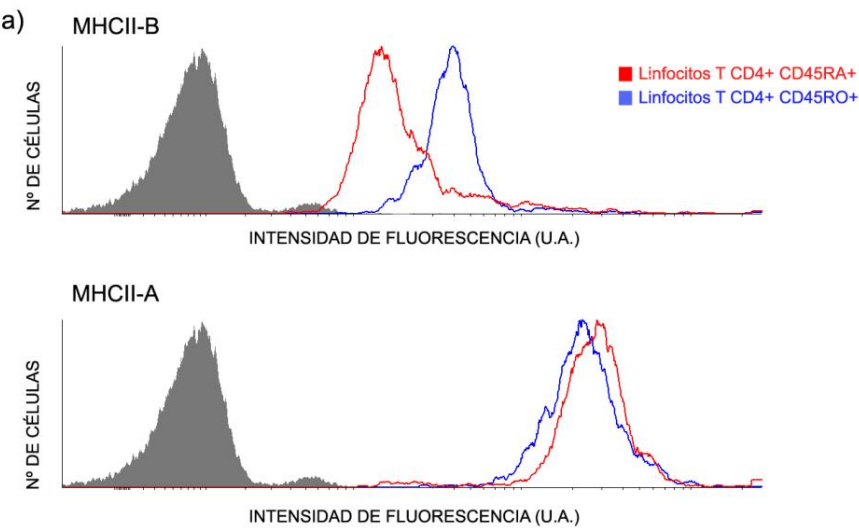
a) Expresión de MHCII-B por citometría de flujo de poblaciones leucocitarias utilizando células sin estimulación. Se determinó el linaje leucocitario por medidas de tamaño y complejidad y diferentes anticuerpos específicos de linaje, indicados en la figura: anti-CD3 para linfocitos T; anti-CD4 para linfocitos T colaboradores; anti-CD8 para linfocitos T citotóxicos; anti-CD14 para monocitos; anti-CD16 para linfocitos NK; anti-CD19 para linfocitos B. Los neutrófilos se excluyeron del análisis por ser negativos para MHCII-B. La expresión de MHCII-B fue determinada por la utilización de un anticuerpo policlonal anti-MHCII-B anteriormente probado por inmunofluorescencia (96). Los perfiles de citometría son una muestra representativa de 10 experimentos independientes realizados en diferentes donantes sanos.

b) Expresión de MHCII-A por citometría de flujo de poblaciones leucocitarias. Ver leyenda del panel (a).

c) Expresión de MHCII-B y MHCII-A por citometría de flujo de linfocitos T CD4+ murinos utilizando células sin estimulación. Se determinó el linaje leucocitario por medidas de tamaño y complejidad y diferentes anticuerpos específicos de linaje. La expresión de MHCII-B y MHCII-A, fue determinada por la utilización de anticuerpos policlonales anti-MHCII-B y anti-MHCII-A anteriormente probado por inmunofluorescencia (96).

Algunos de los experimentos de citometría de flujo en los que se analizaron los linfocitos T CD4+ de donantes sanos revelaron la posible existencia de dos subpoblaciones de acuerdo a la expresión de MHCII-B. Para determinar la posible relación de estas diferencias en la expresión de MHCII-B con una división funcional de las células, decidimos determinar el nivel de expresión de NMII-B de acuerdo a una división funcional en linfocitos T de memoria (CD3+CD4+CD45RO+) y naïve (CD3+CD4+CD45RA+) en linfocitos T CD4+ humanos (**Fig. R4**). Nuestros resultados revelaron que las células T de memoria (que son ligeramente más grandes) humanos expresaban niveles más altos de MHCII-B que las células T naïve del mismo individuo (que son más pequeñas). Por el contrario, las células de memoria expresaban niveles ligeramente más bajos de MHCII-A que las naïve, confirmando que el incremento en contenido relativo de MHCII-B no se debe exclusivamente al mayor tamaño de las células de memoria. Además, estos datos sugieren que los niveles de NMII-B podrían contribuir a algunas de las diferencias fenotípicas que existen entre estas subpoblaciones de linfocitos T humanos Esta diferencia observada en la expresión de MHCII-B entre los linfocitos T naïve y memoria no se observaron en linfocitos T murinos ni en condiciones basales ni estimuladas (no se muestra).

Figura R4



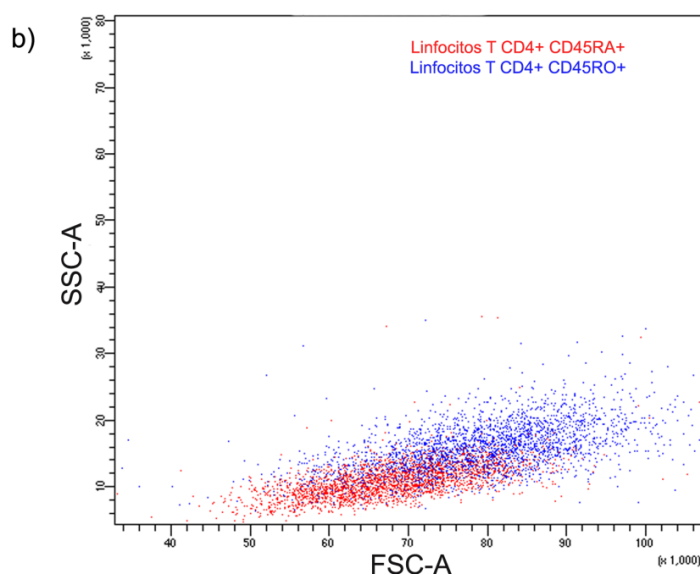


Figura R4 Expresión de MHCII-A y MHCII-B en subpoblaciones linfocitarias de linfocitos T.

a) Análisis por citometría de flujo de poblaciones de linfocitos T de memoria y naïve. Los linfocitos naïve fueron identificados por tamaño/complejidad (para seleccionar la población de PBL) combinado con tinción positiva para CD4 y CD45RA; los memoria eran positivos para CD4 y CD45RO. Para determinar la expresión de MHCII-B (panel superior) y MHCII-A (panel inferior) se utilizaron los anticuerpos policlonales usados en las figuras anteriores. Los perfiles son representativos de diez experimentos realizados con linfocitos de donantes sanos.

b) Diagrama representativo de tamaño/complejidad de los linfocitos T CD45RO+ y CD45RA+. Se observa una diferencia de tamaño y complejidad entre ambas subpoblaciones CD4+.

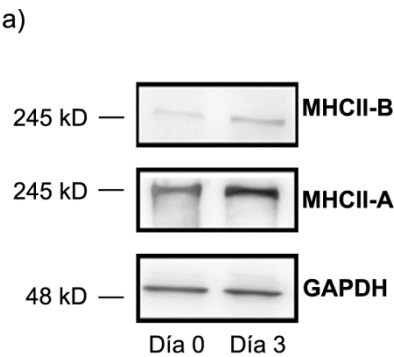
4.2 Los niveles de NMII-B se incrementan en respuesta a PHA, IL-2 y la estimulación vía TCR/CD3.

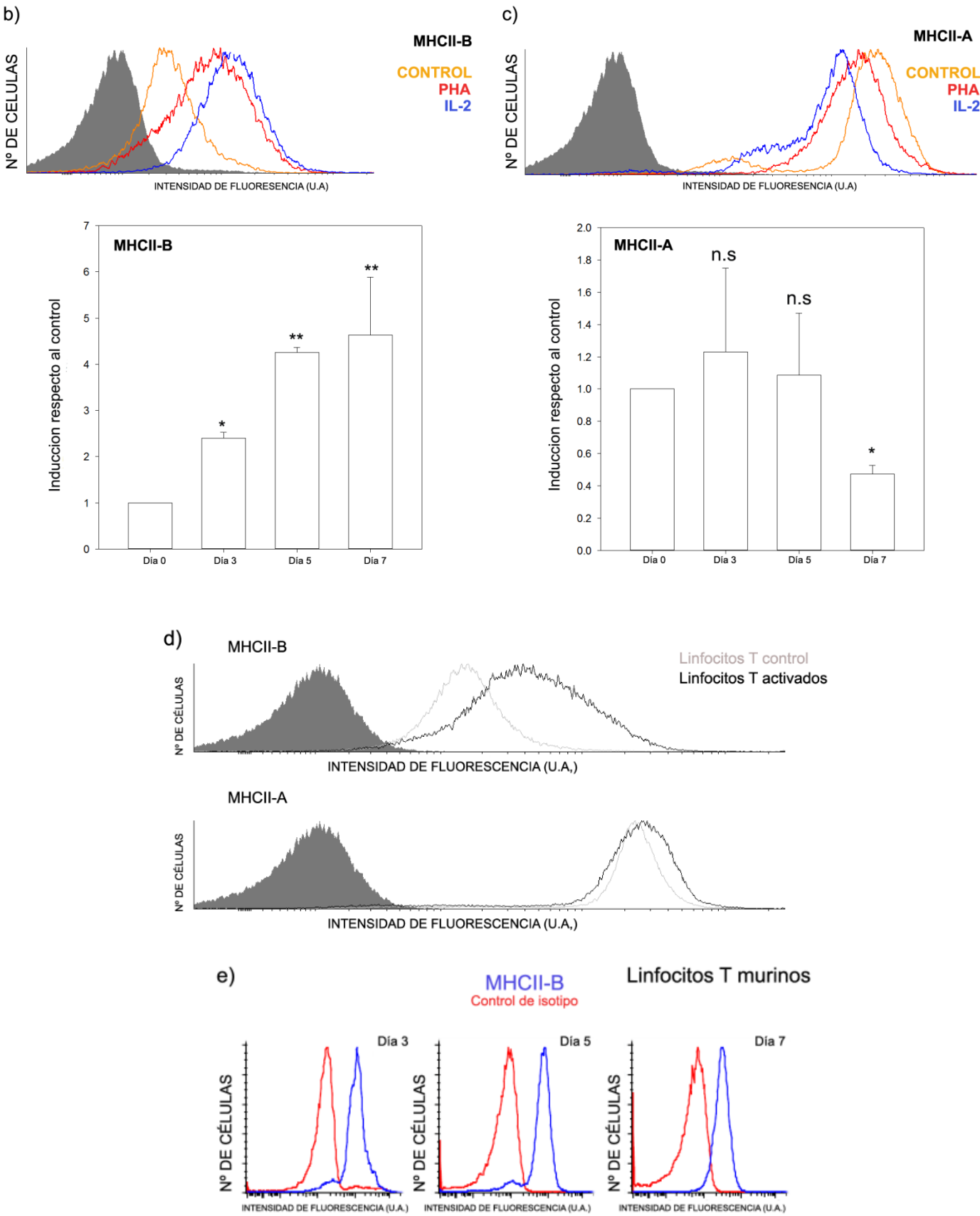
Para determinar si el nivel de expresión de MHCII-B depende del grado de activación del linfocito T, tratamos linfocitos T CD4+ humanos con fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), que es una proteína de origen vegetal capaz de unirse a oligosacáridos de membrana con la capacidad de aglutinar hematíes y leucocitos y que estimula la mitosis de manera inespecífica en diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos (134). El tratamiento de los linfocitos T CD4+ con PHA-L causó un incremento leve en la expresión de MHCII-B (proteína medida por inmunoblot) en respuesta al tratamiento durante 2 días (**Fig. R5A**).

Los linfocitos T CD4+ tratados con PHA-L comienzan a expresar CD25, que es el receptor de alta afinidad para la citoquina IL-2 (135). La IL-2 es un potente mitógeno que controla la proliferación de los linfocitos T efectores así como otras poblaciones, como las T_{REG} (136). Además, la IL-2 participa en el establecimiento de la memoria inmunológica celular (137). El tratamiento de linfocitos CD4+, primero con PHA-L y luego con IL-2, indujo un aumento sustancial de la expresión de MHCII-B en linfocitos T humanos, detectado por citometría de flujo (**Fig. R5B**).

Además del tratamiento con PHA-L e IL-2, los linfocitos T CD4+ se pueden activar de manera antígeno-dependiente, lo que conlleva un incremento en la proliferación y la secreción de IL-2, que actúa como factor autocrino/ paracrino que amplifica la proliferación de los clones respondedores al antígeno. Esta activación dependiente de antígeno se puede imitar eficazmente *in vitro* usando superficies recubiertas con anticuerpos contra CD3 (señal de estimulación) y CD28 (señal de co-estimulación o segunda señal). Para comprobar si este tipo de señalización también inducía la expresión de MHCII-B, purificamos células T CD4+ humanas y las cultivamos sobre superficies tratadas con anticuerpos contra CD3 y CD28. Este tratamiento promovió un aumento modesto, pero reproducible, de la expresión de MHCII-B medido por citometría de flujo (**Fig. R5D**). De manera semejante, la activación de linfocitos T murinos con anti-CD3 y anti-CD28 causó un aumento semejante de la expresión de MHCII-B, tanto en linfocitos T CD4+ (**Fig. R5E**) y (**Fig. R5F**), como en linfocitos T CD8+ (**Fig. R5F**) que no se detectaba en las células sin estimular (**Fig. R3C**). Estos experimentos sugieren que la estimulación antigénica del linfocito T puede regular la expresión de la isoforma MHCII-B. Por el contrario, ninguno de estos tratamientos tuvo un efecto significativo en la expresión de MHCII-A en los linfocitos T, aunque observamos una tendencia a la disminución de la expresión en muchas de las muestras analizadas (ejemplo representativo se puede ver en **Fig. R5C**). Esta diferencia en la respuesta a estímulos activadores y/o proliferativos sugiere diferencias importantes de función y de regulación de ambas isoformas en nuestro modelo.

Figura R5





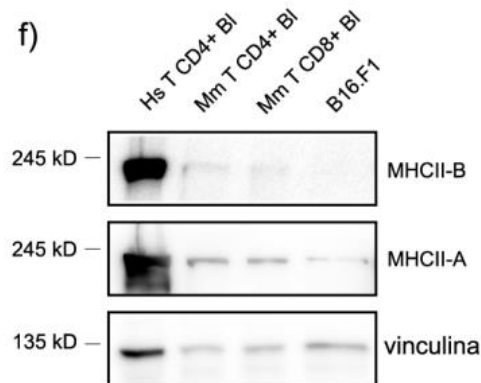


Figura R5 Expresión de MHCII-A y MHCII-B en respuesta a señales mitogénicas e inmunogénicas en linfocitos T murinos y humanos.

a) Inmunoblot que revela el aumento de expresión de MHCII-B en linfocitos T CD4+ aislados por selección negativa, y estimulados con fitohemaglutinina-L (PHA-L, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante tres días. Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH. El experimento es representativo de cuatro realizados.

b) Perfiles de citometría de flujo que demuestran la expresión de MHCII-B durante la activación con PHA-L e IL-2. Se utilizaron linfocitos T CD4+ aislados por selección negativa y se analizaron sin estimular ($t=0$, en naranja); tras dos días de incubación con PHA-L, $1 \mu\text{g/ml}$, (en rojo); y tras cinco días más de estimulación con Interleuquina-2; 100 U/ml , adición de IL-2 cada 48h, en (azul). La cuantificación representa la MFI relativizada al control de isotipo y referida al $t=0$. Los datos son la media \pm SD de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

c) Perfiles de citometría de flujo que demuestran la expresión de MHCII-A durante la activación con PHA-L e IL-2. Ver leyenda de panel (b) para los detalles experimentales.

d) Perfiles de citometría de flujo que demuestran la expresión de MHCII-B durante la activación de linfocitos T CD4+ aislados por selección negativa con anti-CD3 OKT3 ($2.5 \mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 ($1.25 \mu\text{g/ml}$) durante 36 horas. La línea gris corresponde a las células sin activar y la línea negra corresponde a la expresión de MHCII-A y MHCII-B respectivamente en la condición de activación con anti-CD3 y anti-CD28. El experimento es representativo de tres realizados.

e) Perfiles de citometría de flujo que demuestran la expresión de MHCII-B durante la activación de linfocitos T CD4+ murinos aislados por selección negativa. Se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ murinos de preparaciones de ganglios y bazo, y se estimularon con anti-CD3 ($5 \mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$) durante tres días, seguidos por otros cuatro con IL-2, 100 U/ml , adición de IL-2 cada 24h. El experimento es representativo de tres realizados.

f) Inmunoblot que revela la expresión de MHCII-B en linfocitos T CD4+ murinos B estimulados con anti-CD3 ($5 \mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$) durante tres días, seguidos por otros cuatro con IL-2, 100 U/ml , adición de IL-2 cada 24h. También se observa la expresión de MHCII-A en las mismas condiciones de estimulación. Como control positivo del anticuerpo se utilizaron linfoblastos humanos activados y como control negativo la línea celular B16.F10, que no expresa MHCII-B.

Los datos anteriores sugerían que la expresión de MHCII-B se debía a la activación mitogénica de los linfocitos T, pero que la amplificación máxima era debida a la acción de la IL-2, al menos en el caso de los linfocitos T humanos. Para comprobarlo, cultivamos linfocitos T humanos durante 5-7 días con PHA-L y comprobamos la expresión de MHCII-B vía Western Blot (**Fig. R6A**). Estos experimentos revelaron que la expresión de MHCII-B aumentaba en respuesta a PHA-L, pero una vez alcanzado el máximo de expresión por dicho estímulo, la cantidad de proteína no se incrementaba más allá del estímulo inicial. En cambio, experimentos en los cuales se incubaron las células con PHA-L e IL-2 y se examinó la expresión de MHCII-B

vía Western Blot demostró un marcado aumento de la expresión de MHCII-B (**Fig. R6B**), similar a los resultados obtenidos por citometría de flujo (**Fig. R5B**).

Figura R6

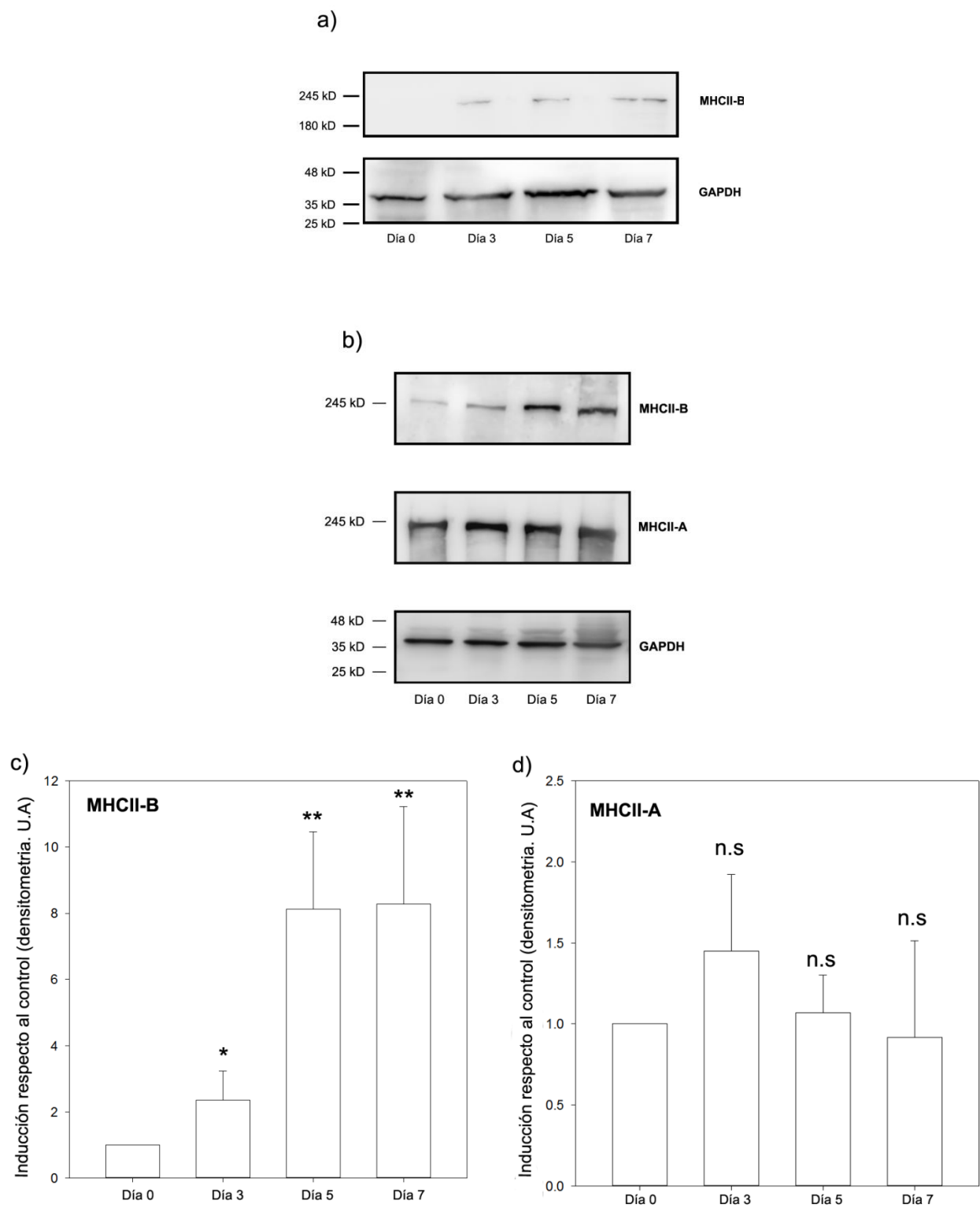


Figura R6. Incremento de la expresión de MHCII-B en respuesta a señales mitogénicas e inmunogénicas en linfocitos T de donantes sanos.

a) Inmunoblot de expresión de MHCII-B en respuesta a fitohemaglutinina-L (PHA-L, $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en linfocitos T CD4+ humanos. Las células se estimularon a tiempo 0 y a días 2 y 5, y las muestras se recogieron a día 0, día 3, día 5 y día 7. GAPDH se muestra como control de carga. El experimento es representativo de tres realizados.

b) Inmunoblot de expresión de MHCII-B y MHCII-A en linfocitos T CD4+ humanos en respuesta a PHA-L e IL-2. Las células se estimularon a tiempo 0 con PHA-L ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) y a día 3 y 5 con Interleuquina-2 ($100 \text{ U}/\text{ml}$). Las muestras se recogieron a día 0 (sin estimular), 3 (PHA-L), día 5 (48h con IL-2) y día 7 (96h con IL-2). GAPDH se muestra como control de carga. El experimento es representativo de seis realizados.

c) Cuantificación por densitometría de los experimentos mostrados en (b) de la inducción de MHCII-B. Los datos están relativizados con respecto a GAPDH y luego con respecto al primer punto experimental. Los datos son la media \pm SD de seis experimentos independientes. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (Test t de Student).

d) Cuantificación por densitometría de los experimentos mostrados en (b) de la inducción de MHCII-A. Los datos están relativizados con respecto a GAPDH y luego con respecto al primer punto experimental. Los datos son la media \pm SD de seis experimentos independientes.

Estos experimentos de expresión de proteína se complementaron con estudios de expresión de mRNA del gen *Myh10* (MHCII-B) por PCR semi-cuantitativa (**Fig. R7A**). El tratamiento inicial con PHA-L aumentó significativamente los niveles del RNA mensajero de MHCII-B en las células T. En cambio, el tratamiento con IL-2 no aumentó dichos niveles más allá del incremento inducido por la PHA-L, manteniéndose al mismo nivel de inducción. Del mismo modo, los niveles de RNA mensajero para el gen *Myh9* (MHCII-A) mostraron una marcada disminución en respuesta a PHA-L, manteniéndose bajos en presencia de IL-2. Es importante recalcar que aunque la caída en la expresión de mRNA de *Myh9* fue muy pronunciada, los niveles de proteína tendían a ser más bajos que en condiciones no estimuladas, pero no significativamente. Estos datos sugieren que, además de los posibles efectos transcripcionales, IL-2 podría modular la regulación de la NMII y sus isoformas/parálogos a diferentes niveles de estabilidad de proteína.

Figura R7

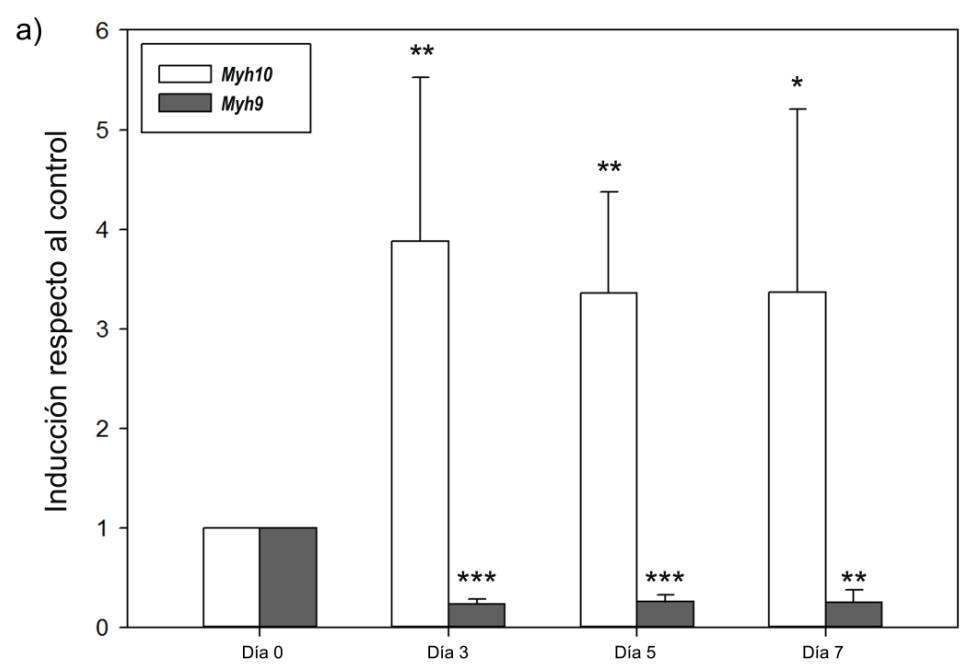


Figura R7 Expresión diferencial de *Myh9* y *Myh10* en respuesta a señales mitogénicas en linfocitos T de donantes sanos.

a) PCR semi-cuantitativa a tiempo real de expresión de *Myh10* (blanco) y *Myh9* (negro) en respuesta a fitohemaglutinina-L (PHA-L, 1 µg/ml) e Interleuquina 2 (IL-2). El cultivo de las células se llevó a cabo como se describe en la figura **R6B**, y la PCR se llevó a cabo en muestras purificadas de ARN retrotranscritas a ADNc. Los resultados son la media ± SD de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Los datos anteriores subrayan la importancia de la señalización vía IL-2 en la inducción de la expresión de MHCII-B. CD25, el receptor de alta afinidad de IL-2, desencadena varias vías de señalización que confluyen en la inducción de la expresión de diferentes genes. Las dos más importantes son a través de la cascada JAK/STAT (STAT5) y la cascada de las MAP quinasas, que participan en la proliferación celular de los linfocitos T dependiente de mitógenos (138). Para determinar la contribución relativa de esta cascada a la expresión de MHCII-B dependiente de IL-2 en células humanas realizamos un ensayo de estimulación de los linfocitos T con PHA-L e IL-2 en presencia de inhibidores de MEK1 (**Fig. R8A**). El aumento observado de la expresión de MHCII-B en las condiciones de activación anteriormente reseñadas se redujo parcialmente en respuesta al tratamiento con el inhibidor PD98059 (MEK1), lo que sugiere que la expresión de MHCII-B está controlada por la vía de las MAP quinasas. El inhibidor PD98059 no tuvo en cambio efecto sobre la expresión de MHCII-A (**Fig. R8B**), lo que confirma la regulación diferencial de la expresión de ambas isoformas durante la activación de los linfocitos T.

Figura R8

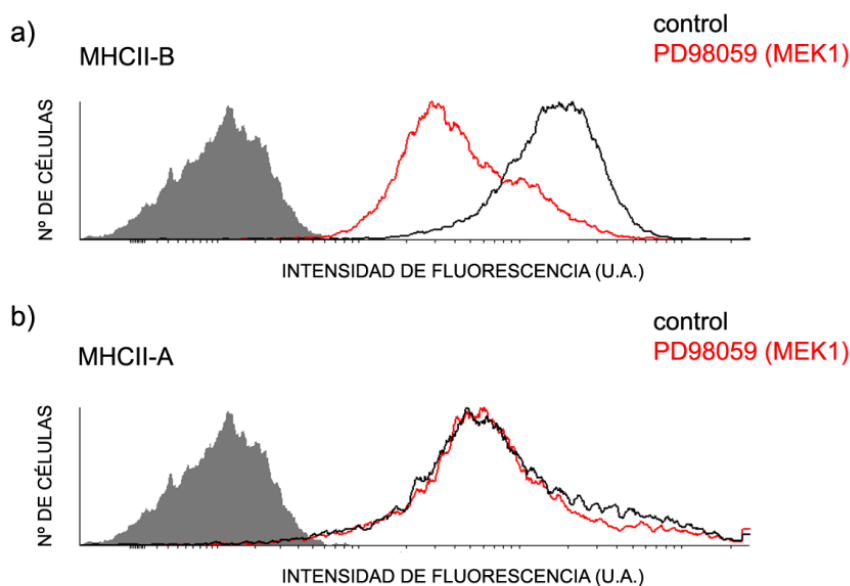


Figura R8 El incremento de expresión de MHCII-B en respuesta a IL2 esta mediado por la vía de las MAP quinasas.

- a) Perfiles de citometría de flujo que muestran la expresión de MHCII-B en linfoblastos T de donantes sanos en respuesta a la activación vía PHA e Interleuquina 2 (ver Fig. R6B), en presencia de DMSO (perfil negro) o del inhibidor PD98059 contra MEK1 (50 μ M) (perfil rojo). Imagen representativa de 3 experimentos.
- b) Perfiles de citometría de flujo que muestran la expresión de MHCII-A en linfoblastos T de donantes sanos en respuesta a la activación vía PHA e Interleuquina 2 (ver Fig. R6B), en presencia de DMSO (perfil negro) o del inhibidor PD98059 contra MEK1 (50 μ M) (perfil rojo). Imagen representativa de 3 experimentos.

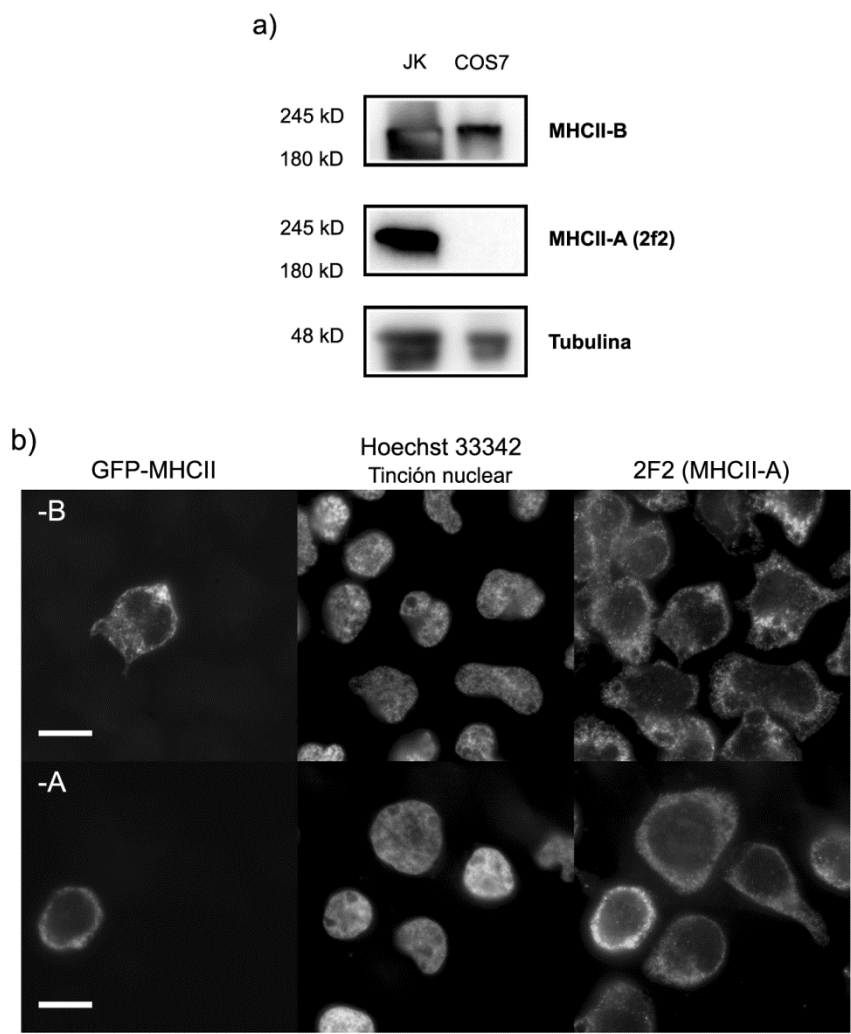
El resumen de este conjunto de experimentos es que, los linfocitos T humanos (así como los monocitos) expresan niveles basales de MHCII-B. En células T tanto humanas como murinas la expresión de MHCII-B aumenta en respuesta a señales de activación, especialmente a través de IL-2, de manera dependiente de MEK1 en linfocitos T humanos.

4.3 La NMII-B controla la polaridad anteroposterior los linfocitos T y la redistribución de marcadores del urópodo celular

La NMII-B controla la polarización celular en las células mesenquimales, por ejemplo fibroblastos (114). De hecho, las células mesenquimales en las que se ha eliminado MHCII-B (usando shRNA) no se polarizan cuando se adhieren a fibronectina en substratos bidimensionales, sino que se extienden uniformemente en todas direcciones, resultando en células planas y redondas sin polo anterior o posterior definidos. En fibroblastos no deplecionados, la NMII-B se localiza en áreas no protrusivas de la célula, definiendo los

laterales y el polo posterior de la célula. Por su parte, la NMII-A se distribuye a lo largo del cuerpo celular y aparece en regiones anteriores más cercanas al frente de avance (96). En linfocitos T humanos, la NMII se describió originalmente en el polo posterior (urópodo) de las células T polarizadas (139). Sin embargo, existían evidencias de la presencia de un compartimento de NMII próxima al frente de avance (140). Para resolver esta aparente contradicción, realizamos tinciones dobles de MHCII-A y MHCII-B endógenas en células T CD4 + humanas activadas mediante el tratamiento secuencial con PHA-L e IL-2 (como se ha indicado en la sección anterior). Para el desarrollo de estas tinciones dobles utilizamos un anticuerpo monoclonal, del que comprobamos previamente su especificidad y afinidad antigénica por MHCII-A (**Fig. R9A y R9B**), así como el silenciamiento específico de las isoformas MHCII-A y MHCII-B (**Fig. R9C**).

Figura R9



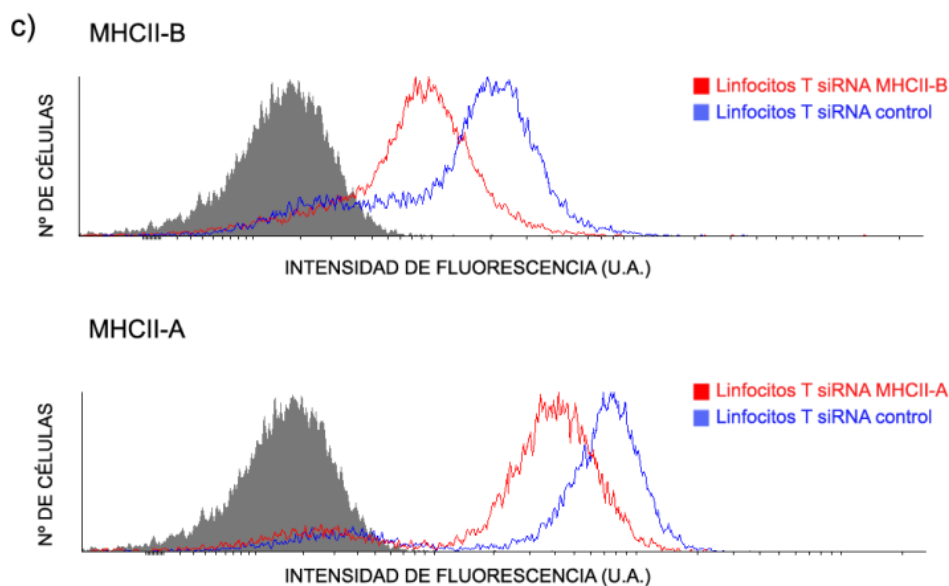


Figura R9 Estudio de la afinidad antigénica del anticuerpo monoclonal 2F2 y silenciamiento específico de MHCII-A y MHCII-B en células linfocitarias.

- a) Inmunoblot de expresión de MHCII-B con un anticuerpo policlonal comercial y de MHCII-A con el anticuerpo monoclonal 2F2, en lisados de células Jurkat y COS7 (que no expresan MHCII-A). Como control de carga se muestra alfa-tubulina.
- b) Imagen de microscopía de fluorescencia de células Jurkat transfectadas transitoriamente con GFP-MHCII-B (paneles superiores) y GFP-MHCII-A (paneles inferiores), teñidas con el anticuerpo monoclonal 2F2 (anti-MHCII-A) y Hoetsch. Barra de escala=10µm.
- c) Perfiles de citometría de flujo representativos del silenciamiento específico por siRNA de MHCII-B (panel superior) como de MHCII-A (panel inferior) en linfocitos T humanos de sangre periférica de donantes sanos.

En linfoblastos T adheridos durante 90 min a fibronectina se observó la localización de NMII-B en el urópodo celular, que se definió por la localización del marcador ICAM-3 (5). Por su parte, la NMII-A se disponía de manera bipolar, localizándose tanto en la zona posterior de la célula como la zona anterior, inmediatamente después del lamelipodio que define el frente de avance (**Fig. R10A**).

Figura R10

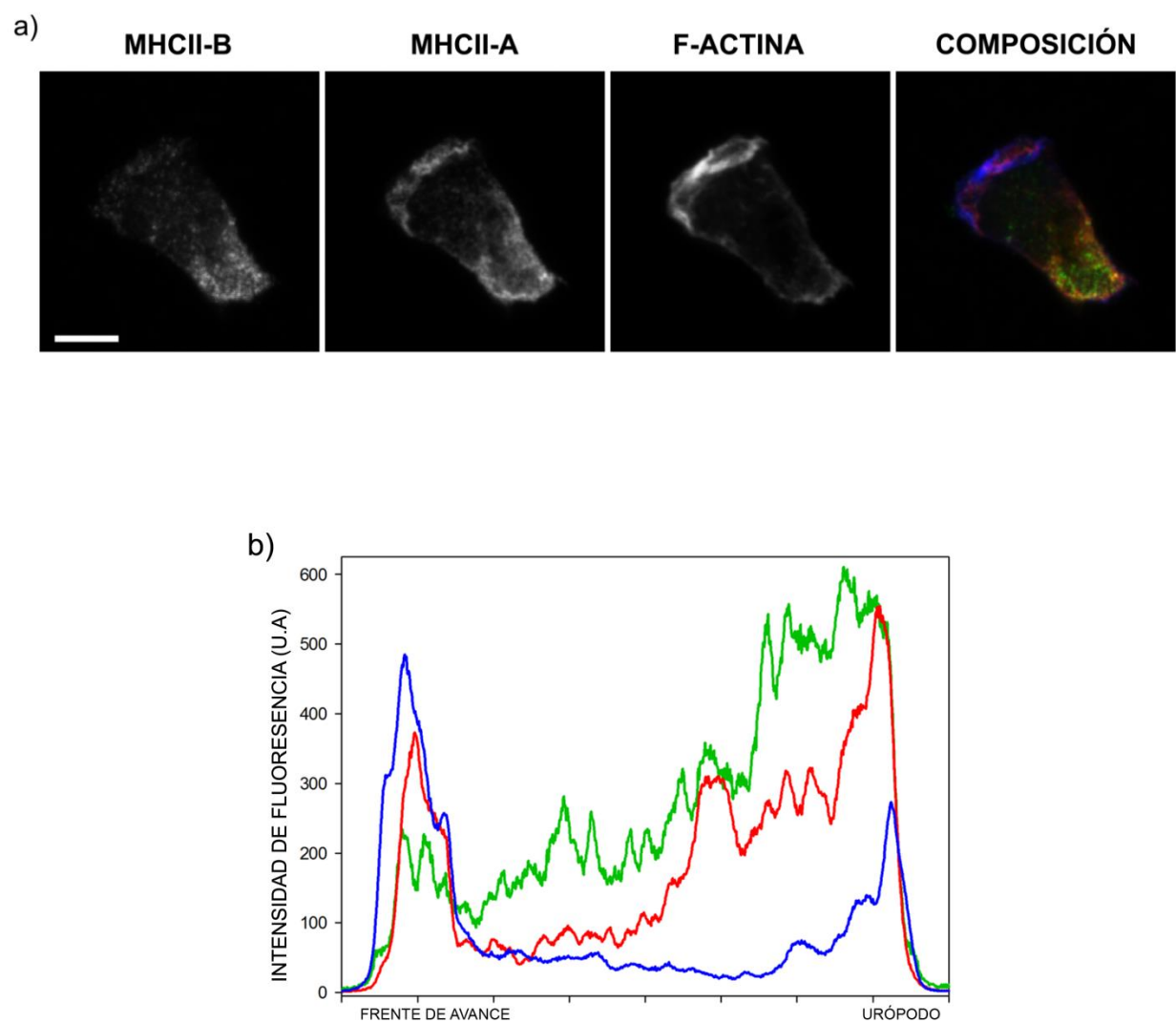


Figura R10 Localización diferencial de MHCII-B y MHCII-A en linfoblastos T polarizados sobre fibronectina.

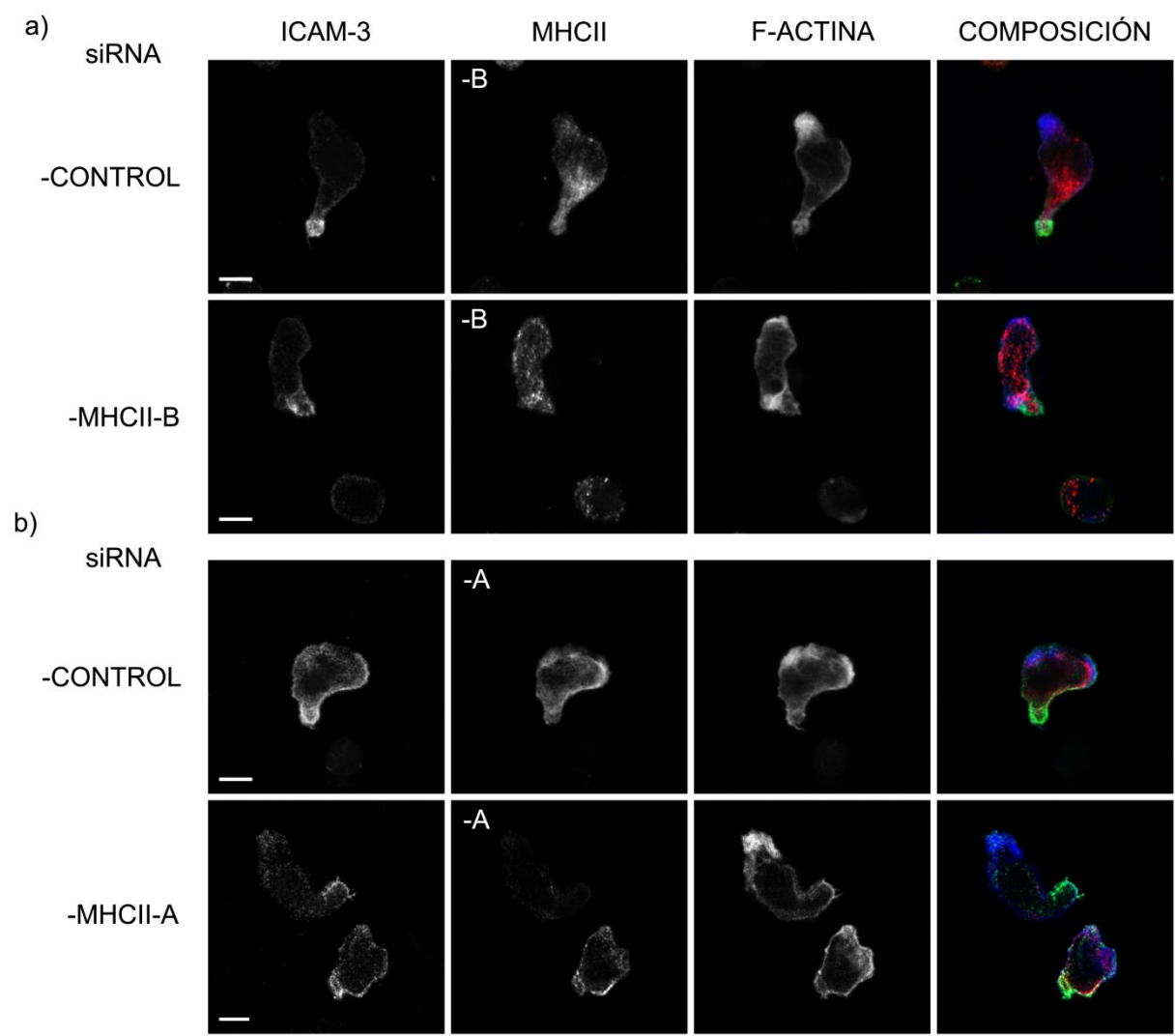
a) Imagen de un linfoblasto T humano aislado pre-activado con PHA-L e IL-2 (d5) adherido y polarizado sobre una superficie de fibronectina (40 µg/ml) en el que se ha teñido MHCII-B y MHCII-A, junto con F-actina. Se observa la localización preferencial de la MHCII-B (en verde en la composición final) en la zona posterior de la célula, mientras que la MHCII-A (en rojo) presenta una localización bipolar, tanto en el frente de avance como en la zona posterior. La F- actina (en azul) marcada con faloidina se localiza preferencialmente en la zona delantera de la célula o lamelipodio, denominado frente de avance, justo por delante de la MHCII-A. Barra de escala=10µm.

b) Densitometría representativa de la localización posterior de MHCII-B (en verde); MHCII-A (en rojo) presenta una distribución bipolar ligeramente retrasada en el frente de avance con respecto a la F-actina (en azul).

La semejanza de la distribución de NMII-A/NMII-B en linfocitos T y en células mesenquimales nos permitió formular la hipótesis de que, como en estas últimas, la NMII-B definía la polaridad celular en las células T humanas. Esta hipótesis se comprobó en linfoblastos T CD4+ transfectados con un siRNA que inhibió específicamente la expresión de MHCII-B humano. En condiciones basales, estas células exhiben un alto grado de polarización espontánea como se ilustra por la localización de los marcadores canónicos de la parte

posterior (ICAM-3) y frontal (F-actina), respectivamente (**Fig. R11**). La inhibición de la expresión de MHCII-B disminuyó significativamente la polaridad celular de las células silenciadas para esta proteína, causando una pérdida de la polaridad del marcador del urópodo ICAM-3 (**Fig. R11A, segunda línea, célula inferior**). Por el contrario, el silenciamiento específico de MHCII-A no tuvo un efecto significativo sobre la polarización de las células T (**Fig. R11B, segunda línea, célula superior**). La cuantificación de este fenómeno se realizó a través del índice de polaridad de los linfocitos T, que se define como la longitud máxima a lo largo del eje definido por el frente de avance y el urópodo dividida por la medida ortogonal que pasa a través del centro del núcleo, en la condición control, de silenciamiento de MHCII-B y de MHCII-A figura (**Fig. R11C**). Estos datos demuestran que la MHCII-B, y por tanto el parálogo NMII-B desempeña una función fundamental en la polarización de los linfocitos T humanos activados.

Figura R11



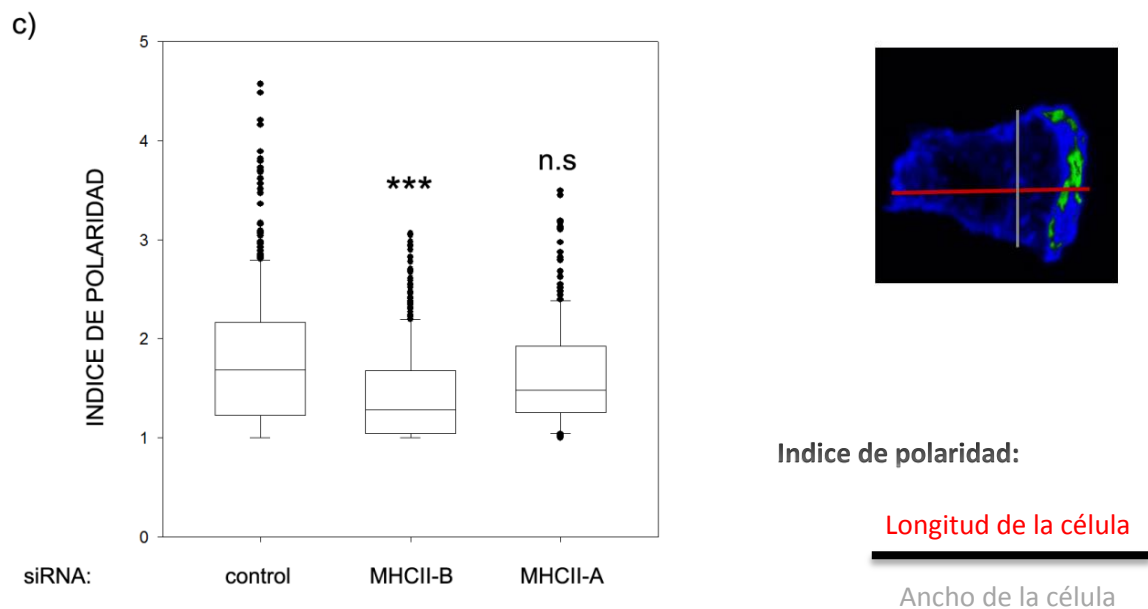


Figura R11 El silenciamiento específico de MHCII-B afecta a la polarización celular de los linfoblastos T dispuestos sobre una superficie de fibronectina y modifica la localización celular de los marcadores de polaridad como ICAM-3.

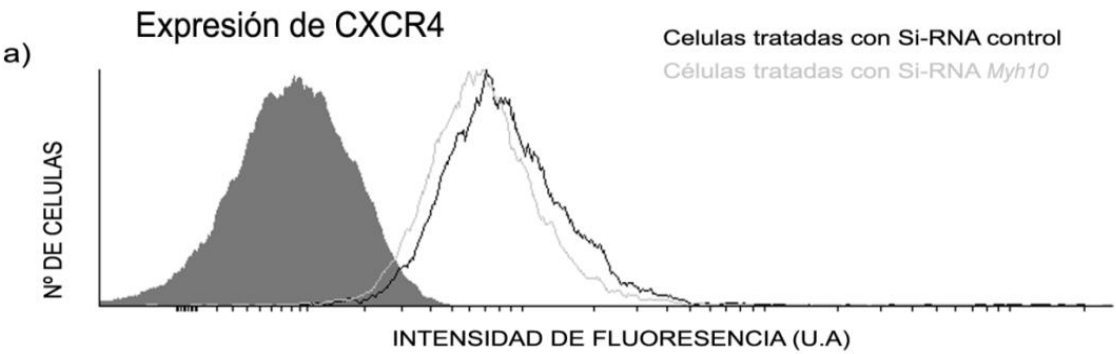
a) Imágenes representativas de linfoblastos T pre-activados con PHA e IL-2 (d5), transfectados con siRNA control o contra MHCII-B y polarizados sobre una superficie de fibronectina (40 µg/ml). En la parte superior de la imagen se observa un linfoblasto T pre-activado tratado con siRNA control, en el cual se comprueba la localización preferencial de la MHCII-B en la zona posterior de la célula, utilizando la tinción de ICAM-3 para marcar el urópodo. También se muestra la tinción de F-actina con faloidina. En los paneles inferiores se pueden ver dos células: en la célula en la parte superior no se observa depleción de MHCII-B y está polarizada; por el contrario, la célula localizada en la parte inferior de la imagen corresponde a un linfoblasto T silenciado para MHCII-B. Se observa la marcada disminución de expresión de la proteína así como la pérdida de polaridad celular y la distribución polarizada de ICAM-3. Este efecto está cuantificado en (C) Barra de escala=10µm.

b) Imágenes representativas de linfoblastos T pre-activados con PHA e IL-2 (d5), transfectados con siRNA control o contra MHCII-A y polarizados sobre una superficie de fibronectina (40 µg/ml). En la parte superior de la imagen se observa un linfoblasto T pre-activado tratado con siRNA control, en el cual se comprueba la localización bipolar de la MHCII-A, utilizando la tinción de ICAM-3 para marcar el urópodo. También se muestra la tinción de F-actina con faloidina. En los paneles inferiores se pueden ver dos células: en la célula en la parte inferior no se observa depleción de MHCII-A y está polarizada; por el contrario, la célula localizada en la parte superior de la imagen corresponde a un linfoblasto T silenciado para MHCII-A. Se observa la marcada disminución de expresión de la proteína, pero la célula permanece polarizada e ICAM-3 define el urópodo celular. Este efecto está cuantificado en (C) Barra de escala=10µm.

c) Cuantificación del índice de polaridad celular en condiciones control, de silenciamiento de MHCII-B y silenciamiento de MHCII-A, utilizando el índice de polaridad de los linfocitos T definido a la derecha de la imagen como el cociente entre el eje mayor de la elipse que mejor define el contorno celular dividido por el eje menor que pasa a través del centro del núcleo. N= 450 células. ** <0.01 (Mann-Whitney test).

La polaridad es un evento clave en la migración de los linfocitos T. En general, las condiciones que previenen la adquisición de un fenotipo polarizado previenen también la capacidad de las células para migrar (139, 141, 142). Por otra parte la NMII-B es necesaria para la migración de las células mesenquimales en condiciones de confinamiento ya que empuja el núcleo para que la célula pase a través de los poros de los geles de colágeno en tres dimensiones (143). Por ello, postulamos que la NMII-B es necesaria para la migración de los linfocitos T. Para comprobarlo, disminuimos la expresión de MHCII-A o MHCII-B en linfocitos T primarios humanos de donantes sanos tratados como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, las células se hicieron migrar en cámaras de Boyden modificadas (Transwell) hacia la quimioquina CXCL12/SDF1 α . En primer lugar determinamos que la depleción de MHCII-A o II-B no afectaba a los niveles del receptor de CXCL12, CXCR4 (**Fig. R12A**). Por otra parte, la inhibición de la expresión de MHCII-B disminuyó significativamente la respuesta quimiotáctica a CXCL12, mientras que la depleción de MHCII-A no causó un efecto significativo, aunque también observamos una tendencia a la inhibición de la migración (**Fig. R12B**).

Figura R12



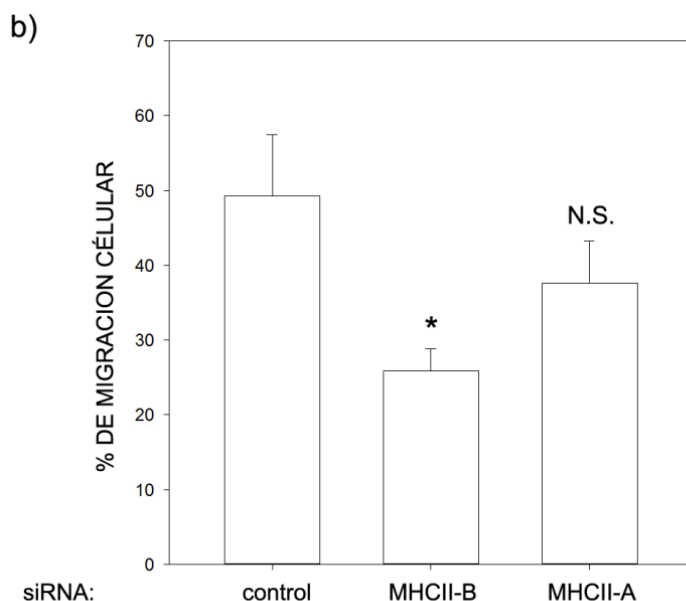


Figura R12 El silenciamiento específico de MHCII-B en los linfoblastos T humanos de donantes sanos disminuye la capacidad de migración a través de una membrana semipermeable en respuesta a CXCL12.

a) Perfil representativo de citometría de flujo que muestra la expresión del receptor CXCR4 en la condición de silenciamiento de MHCII-B (en gris), con respecto a la expresión de CXCR4 en las células tratadas con el siRNA control (en negro).

b) Cuantificación del porcentaje de linfoblastos T pre-activados con PHA e IL-2 silenciados para MHCII-A o MHCII-B que han migrado a través de una membrana Transwell (3.0 μm de tamaño de poro), en la condición control, silenciadas para MHCII-B o para MHCII-A. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Procedimiento de comparación múltiple * $p < 0.05$ (Holm-Sidak).

Además de los efectos descritos en la polaridad, la NMII-B también controla la extensión del área de contacto adhesivo entre las células mesenquimales y la matriz extracelular. Específicamente, las células deplecionadas de MHCII-B presentan una superficie exageradamente grande comparada con la de las células control (96). Para estudiar si este fenómeno se extendía a células linfoides, se realizaron experimentos similares en la línea celular Jurkat. En primer lugar, para comprobar el silenciamiento específico de estas células se realizaron ensayos de PCR semi-cuantitativa, citometría de flujo y Western Blot a 72h post-trasfección (**Fig. R13**).

Figura R13

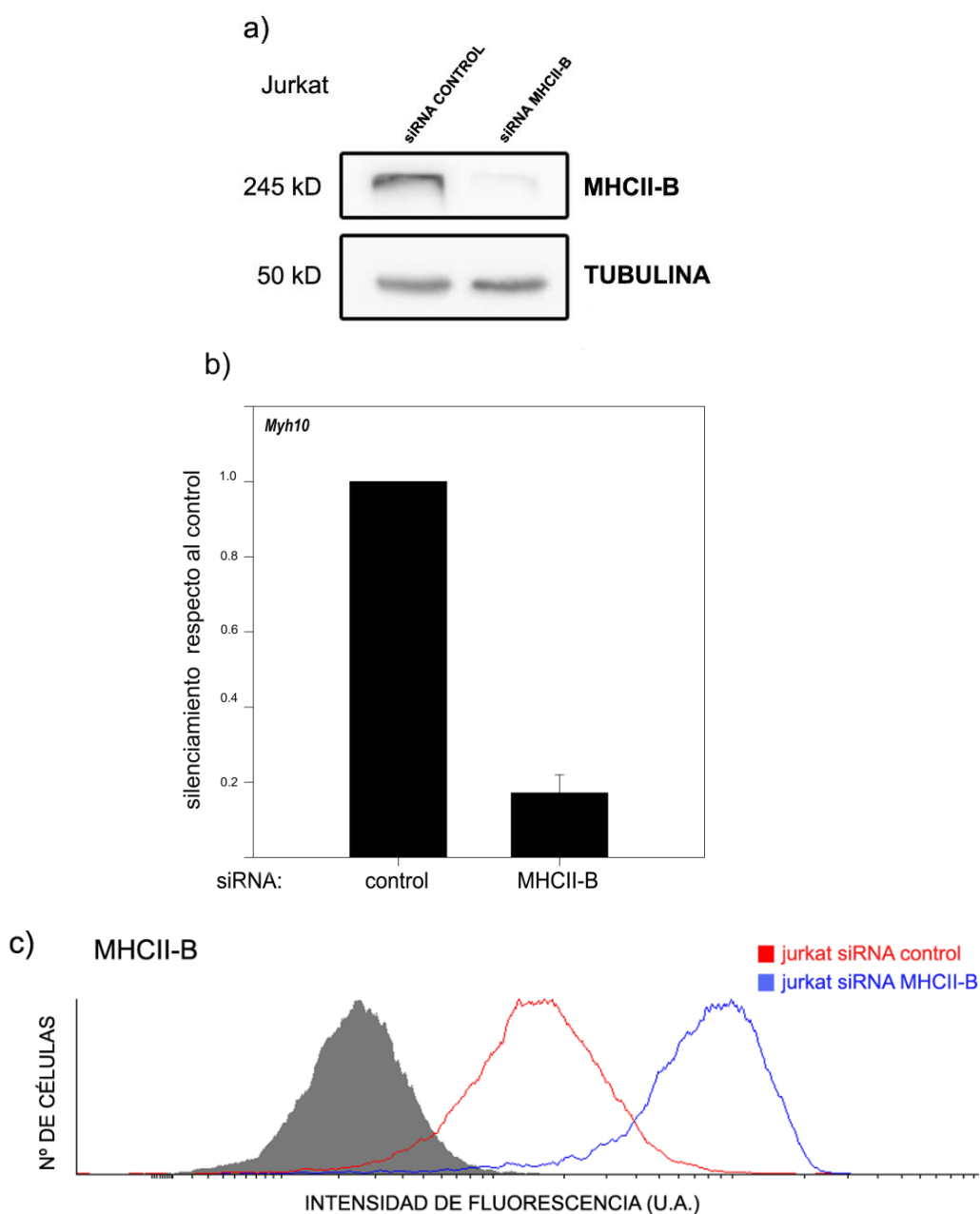


Figura R13. Eficacia del silenciamiento específico de MHCII-B mediante siRNA en células Jurkat.

a) Inmunoblot representativo de MHCII-B en células Jurkat control y silenciadas para MHCII-B utilizando el anticuerpo policlonal anteriormente descrito. Se muestra alfa-tubulina como control de carga.

b) Análisis por PCR semi-cuantitativa de la expresión del gen *Myh10* en células Jurkat control y silenciadas para MHCII-B mediante siRNA. Los valores están relativizados primero a la expresión del gen de referencia GAPDH y posteriormente a la condición control (100%). Los datos son la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

c) Perfiles representativos de citometría de flujo de células Jurkat transfectadas con siRNA control o contra MHCII-B durante 72h, y teñidas utilizando el anticuerpo contra MHCII-B descrito anteriormente. Estos perfiles son una muestra representativa de >10 comprobaciones de silenciamiento realizadas antes de otros ensayos funcionales (ver siguientes secciones).

Figura R14

c)

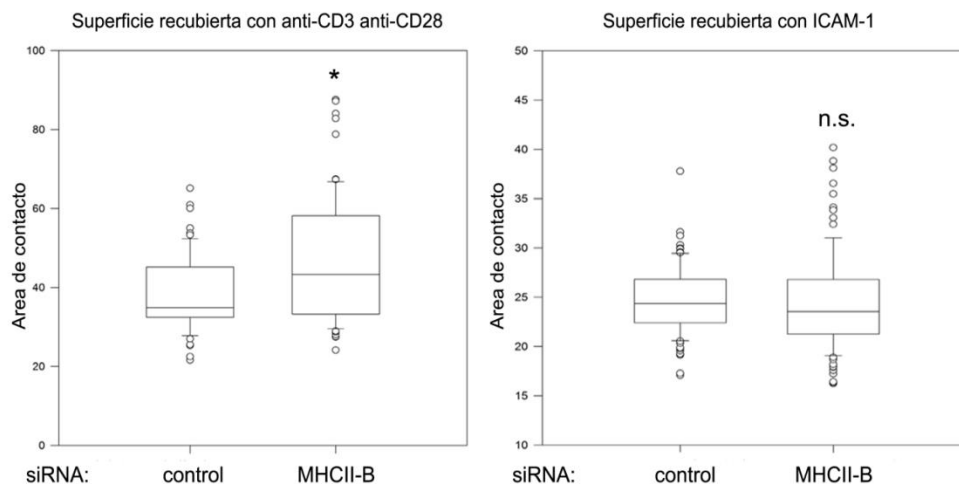


Figura R14 El silenciamiento específico de MHCII-B aumenta la superficie de contacto del linfocito T con una superficie recubierta con anticuerpos contra CD3 y CD28.

a) Imágenes representativas de células Jurkat control y silenciadas para MHCII-B, adheridas a cubreobjetos recubiertos con anti-CD3 (2.5 µg/ml) y anti-CD28 (1.25 µg/ml) y teñidas con F-actina para delimitar el área de la célula. Barra de escala=20µm.

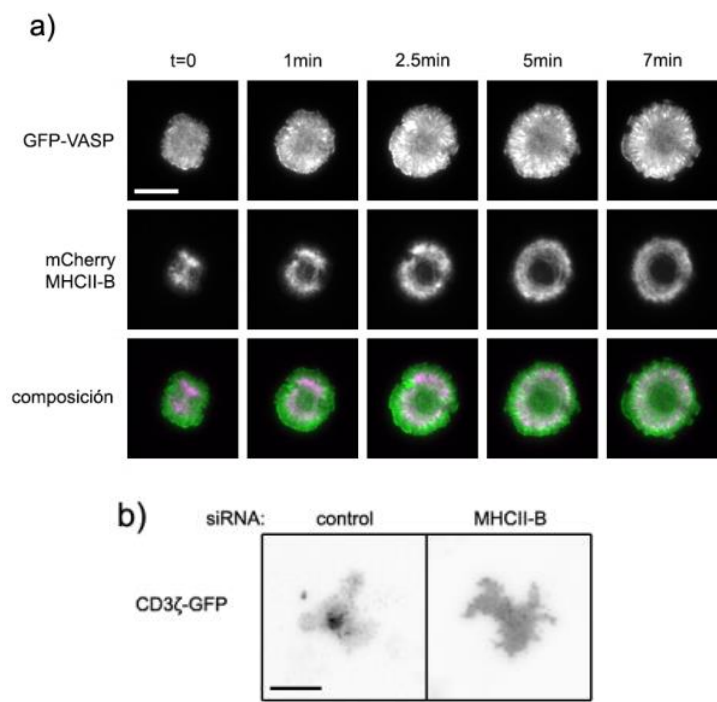
b) Imágenes representativas de células Jurkat control y silenciadas para MHCII-B, adheridas a cubreobjetos recubiertos con ICAM-1 recombinante (2 µg/ml) y teñidas con F-actina para delimitar el área de la célula. Barra de escala=20µm.

c) Cuantificación de las áreas de contacto con el sustrato (medidas en µm²) entre las células control y las células silenciadas para MHCII-B sobre anti-CD3+anti-CD28 a (panel izquierdo) e ICAM-1 (panel derecho), correspondiente a imágenes como las mostradas en (a) y (b). Los datos corresponden a >120 medidas independientes en tres experimentos distintos. Análisis de varianza en rangos de una vía, (Kruskal-Wallis), *P<0.05.

Este efecto del silenciamiento de la NMII-B sobre la nos permitió formular una nueva hipótesis de acuerdo a la que la NMII-B controla la extensión celular a través del control del citoesqueleto de actina, complementando la información existente para la NMII-A en este proceso (144). En primer lugar, examinamos la localización de la NMII-B durante la extensión sobre anti-CD3, usando para ello una quimera de MHCII-B fusionada con EGFP. En primer lugar, examinamos la localización de la NMII-B durante la extensión sobre anti-CD3, usando para ello una quimera de MHCII-B fusionada con mCherry. Desde los primeros minutos de extensión, la mCherry-MHCII-B se dispone formando un anillo único que define el espacio de la lamela. Este espacio avanza de manera centrífuga ampliando la superficie de contacto con el sustrato (anti-CD3). Justo delante, existe una zona donde se localizan, entre otros, el complejo Arp2/3 (Arp3-GFP, no mostrado), el nucleador de actina VASP (Fig. 15A) y moléculas implicadas en señalización por

integrinas, por ejemplo un sensor de Tyr fosforiladas (GFP-dSH2) (145), no se muestra. Esta zona es el equivalente al lamelipodio, y está desprovisto de NMII-B. En la zona de transición Lp-Lm, se observa la acumulación de GFP-VASP formando estructuras alargadas que recuerdan a los contactos focales descritos en la frontera Lp-Lm en células mesenquimales (146, 147). Este movimiento de la NMII-B, similar al descrito en (148) para NMII-A, podría estar implicado en la redistribución centrípeta de TCR/CD3 hasta formar un gran agregado central que imita la distribución de estas moléculas al cSMAC (22, 45) . En células deplecionadas de NMII-B, comprobamos que CD3 (observado por co-expresión de la quimera CD3ζ-GFP) no se localizaba de manera compacta de manera similar a la localización de la proteína en la mayor parte de los controles (22, 47) (**Fig. R15B**). Estos datos indican que la NMII-B es importante para la redistribución del TCR/CD3 a la zona de contacto.

Figura R15



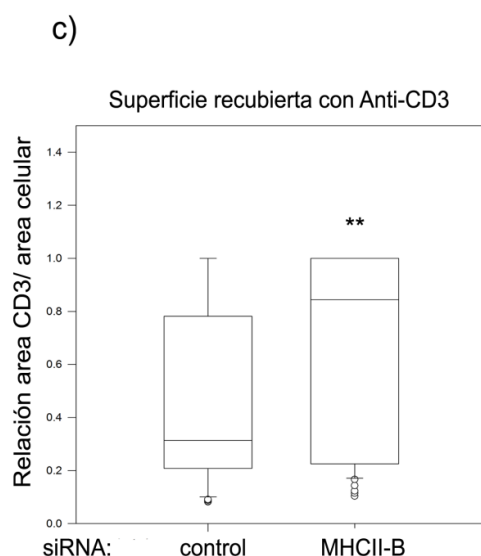


Figura R15 El silenciamiento específico de MHCII-B reduce el agrupamiento del CD3 de los linfocitos T adheridos sobre una superficie recubierta con anticuerpos contra CD3 y CD28.

a) Imágenes representativas de un video de dinámica celular de células Jurkat transfectantes transitorias para VASP-GFP y mCherry-MHCII-B adheridas a una cubreobjetos recubierto con anti-CD3 (2.5 µg/ml) y anti-CD28 (1.25 µg/ml), se observa la disposición de la mCherry-MHCII-B en el espacio lamelar alrededor del núcleo, mientras que Vasp-GFP se localiza preferentemente en la periférica celular, que asemeja al lamelipodio. Barra de escala=20µm

b) Imágenes representativas de células Jurkat control y silenciadas para MHCII-B co-transfectadas con CD3ζ-GFP, adheridas durante 30 min sobre cubreobjetos recubiertos con anti-CD3 (2.5 µg/ml) y anti-CD28 (1.25 µg/ml). Barra de escala=20µm

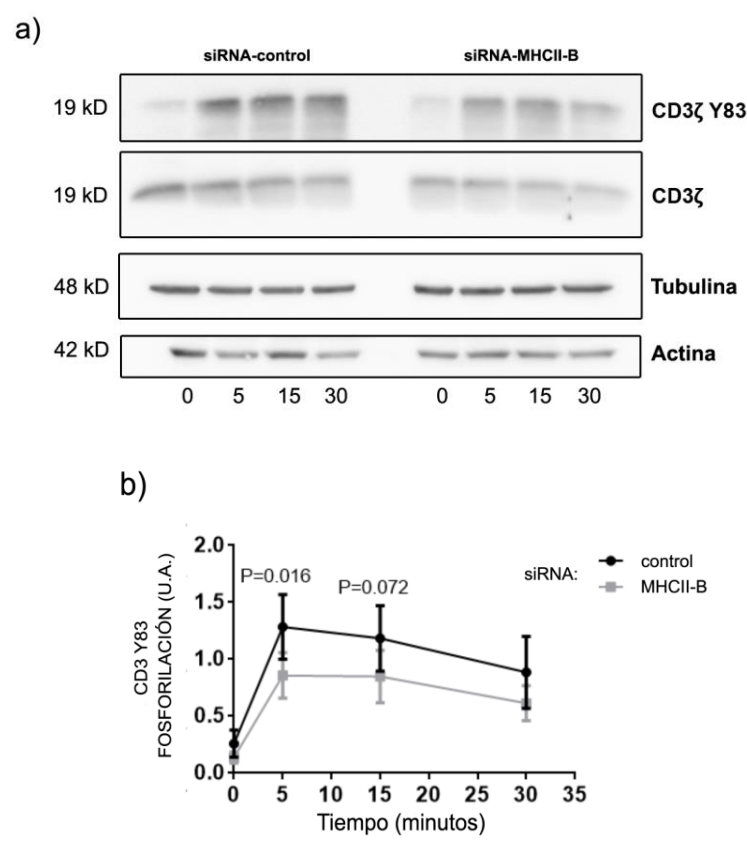
c) Cuantificación del agrupamiento de CD3ζ-GFP, medido como el cociente del área marcada con CD3ζ-GFP con respecto al área total de la célula (definida con F-actina) en las células control y las silenciadas para MHCII-B. Los datos corresponden a >120 medidas independientes en tres experimentos distintos. ** p<0.01 (Mann-Whitney test)

4.3 La NMII-B regula la activación de las células T en respuesta a estímulos TCR dependientes.

Los datos descritos en la sección anterior sugieren que la NMII-B controla la distribución del complejo TCR/CD3 durante la activación del linfocito T. Dicha distribución es necesaria para que la célula T se active correctamente (149). Por tanto, planteamos la hipótesis de que el silenciamiento específico de MHCII-B, y por tanto la consiguiente eliminación del parálogo NMII-B, inhibe la activación en respuesta a la estimulación antigénica. Para verificar esta posibilidad, utilizamos el modelo de células Jurkat, que se activa de manera similar a la estimulación antígeno-dependiente cuando las células presentadoras (Raji) se incuban con súper antígeno E (150), que se une a la cadena Vβ8 del TCR de las Jurkat. La incubación de células Jurkat que expresan niveles reducidos de MHCII-B (hasta un 80% por qPCR) (**Fig. R13B**) con Raji cargadas con SEE produjo una modesta reducción de los niveles de fosforilación de CD3ζ concretamente en el aminoácido

tirosina 83 (Y83), fundamentalmente debido a un nivel de fosforilación más bajo de estos residuos en condiciones basales (**Fig. R16A-B**). Esto sugiere que, como se ha propuesto anteriormente, la activación del complejo TCR/CD3 depende, al menos parcialmente, del agrupamiento de los receptores (151). Dado que el silenciamiento de MHCII-B inhibe el reagrupamiento de CD3 (**Fig. R15**), hipotetizamos que las células silenciadas para MHCII-B no se activarían normalmente en respuesta a señales antigénicas. Para ello, estudiamos la expresión de proteínas que se inducen durante la activación de los linfocitos T. En paralelo a estos experimentos de fosforilaciones temprana de los co-receptores del TCR realizamos un ensayo de activación final de las células silenciadas para NMII-B, para ello examinamos la expresión de CD69, un marcador temprano de la activación completa de los linfocitos T (80). Observamos que la depleción de MHCII-B inhibió modesta pero reproduciblemente la expresión de CD69 en respuesta a la conjugación de células Jurkat con Raji cargadas con SEE (**Fig. R16C-D**).

Figura R16



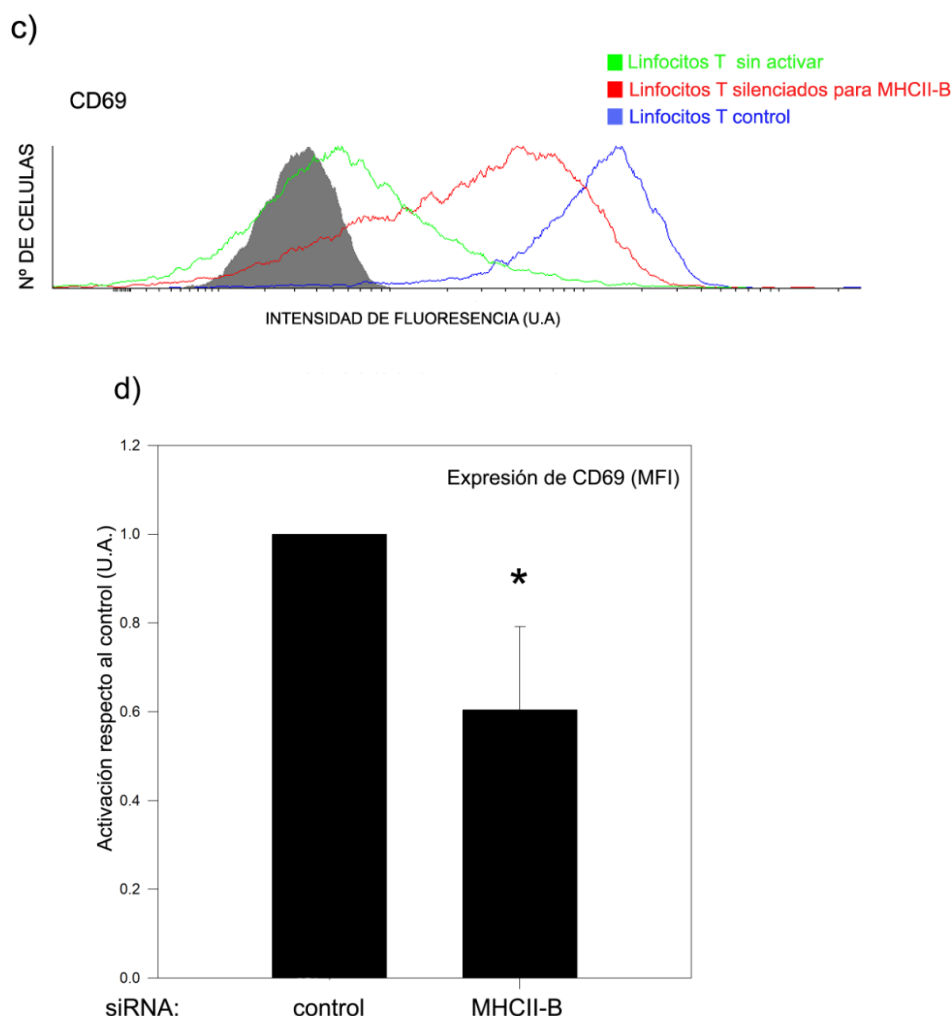


Figura R16. El silenciamiento específico de MHCII-B inhibe la fosforilación de CD3 ζ y la expresión del marcador de activación CD69.

a) Inmunoblot de CD3 ζ (total) y de CD3 ζ fosforilado en el residuo de tirosina de la posición 83 (Y83), utilizamos el modelo de células Jurkat, activadas de manera antígeno-dependiente con células presentadoras (Raji) incubadas con SEE, en condiciones de control y de silenciamiento para NMII-B mediante siRNA se observa una modesta reducción de los niveles de fosforilación de CD3 ζ concretamente en el aminoácido tirosina 83 (Y83), fundamentalmente en las etapas iniciales de la sinapsis. Como control de carga se utilizaron los anticuerpos anti-tubulina y anti-actina.

b) Cuantificación del nivel de fosforilación de Y83 por densitometría correspondiente a los experimentos mostrados en (a). Los datos son la media \pm SD de 5 experimentos realizados de manera independiente. (test t de Student apareada)

c) Perfiles de citometría de flujo representativos que muestran la expresión de CD69 en las células Jurkat control activadas durante 12h con células Raji sin carga (verde); Jurkat control activadas con células Raji cargadas con SEE (azul); y Jurkat silenciadas para MHCII-B activadas con células Raji cargadas con SEE (rojo). Las células Raji se excluyeron del análisis por su expresión positiva para CD20.

d) Cuantificación de la expresión de CD69 correspondiente a los experimentos mostrados en (c). Los datos están relativizados al nivel de expresión de células Jurkat control activadas con células Raji cargadas con SEE. Los datos son la media \pm SD de 6 experimentos realizados de manera independiente. *P<0.01 (test t de Student con 4 grados de libertad).

4.4 La NMII-B determina la extensión y segregación molecular del contacto de la célula T con la CPA.

Todo lo anteriormente expuesto indica que la NMII-B controla la morfología de las interacciones adhesivas de los linfocitos T, particularmente las interacciones de los linfocitos T activados (que expresan niveles elevados de MHCII-B) vía integrinas y/o TCR/CD3. Basándonos en estos datos, postulamos que la NMII-B controla la reorganización de las células T durante el contacto con las células presentadoras de antígeno en el contexto de la presentación antigénica. Para analizar esta posibilidad, visualizamos las interacciones entre células T humanas (Jurkat) y CPA (Raji +SEE) por microscopia Confocal. Las tinciones de MHCII-B endógena revelaron que la NMII-B se localiza principalmente en la región sináptica, preferentemente definiendo los bordes del contacto entre el linfocito T y la CPA, en el borde exterior del pSMAC (**Fig. R17a y d**). Experimentos realizados en células Jurkat que expresaban la quimera GFP-MHCII-B demostraron que esta construcción se localizaba de manera muy similar a la proteína endógena (**Fig. R17c**). Por su parte, la MHCII-A (que define NMII-A) se localizaba de manera similar a MHCII-B en estos contactos (**Fig. R17b**), lo que sugiere que, a diferencia de lo observado tanto en modelos mesenquimales como en células polarizadas que no forman sinapsis, los dos parálogos pierden su segregación espacial durante la activación.

Figura R17

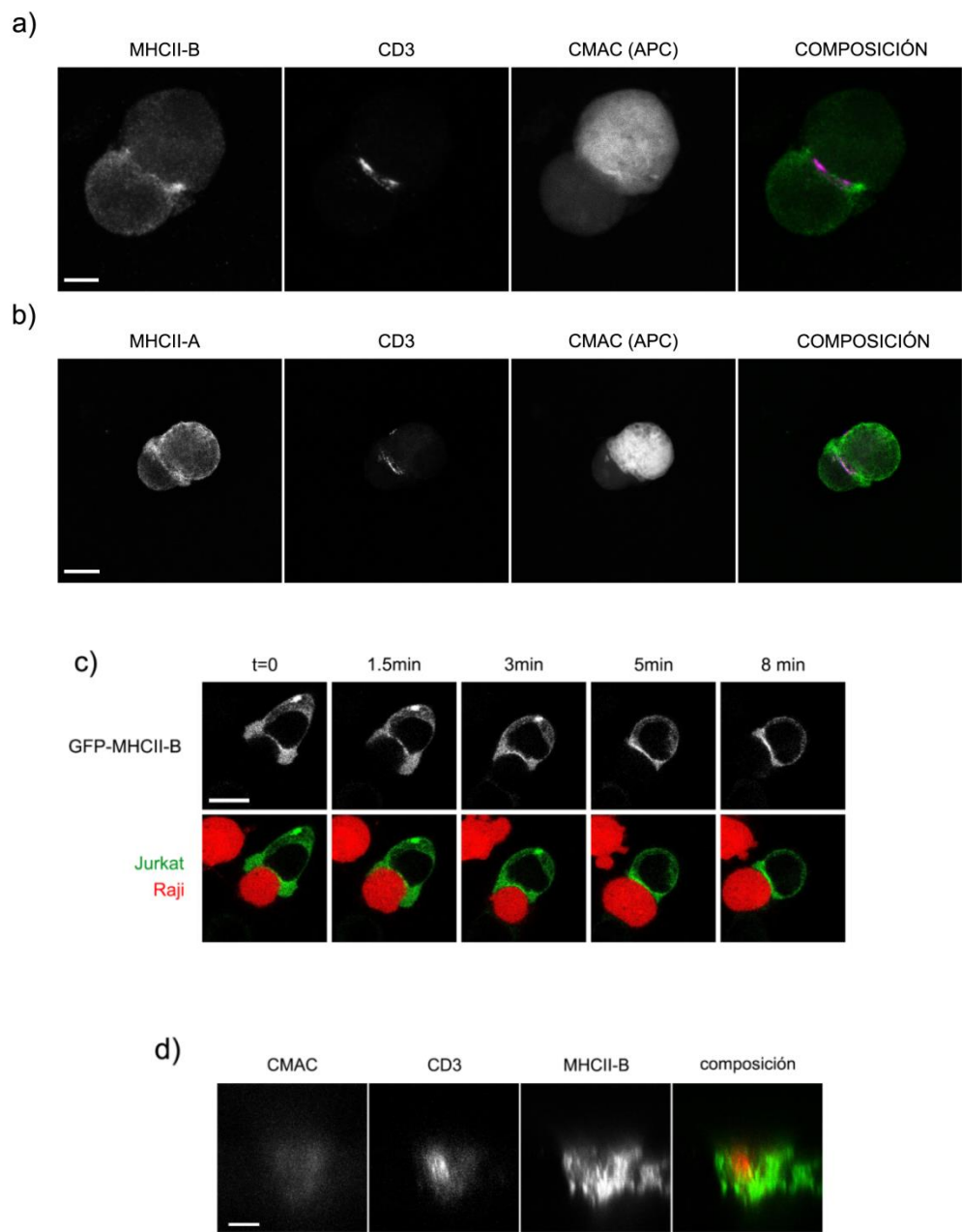


Figura R17 Localización de MHCII-A y MHCII-B en la periferia de la sinapsis inmune.

- a) Imagen de microscopía Confocal de células Jurkat formando conjugados con células Raji pre-incubadas con SEE y CMAC, teñidas con anticuerpos contra MHCII-B y CD3 (para definir el contacto sináptico). Barra de escala=10µm.
- b) Imagen de microscopía Confocal de células Jurkat formando conjugados con células Raji pre-incubadas con SEE y CMAC, teñidas con anticuerpos contra MHCII-A y CD3 (para definir el contacto sináptico). Barra de escala=10µm.
- c) Secuencia de imágenes de microscopía Confocal de células Jurkat transfectantes transitorias con GFP-MHCII-B formando conjugados con células Raji pre-incubadas con SEE y CMAC. La duración de los conjugados es de aproximadamente 10 minutos. Barra de escala=10µm.

d) Reconstrucción de imágenes de microscopía Confocal en el eje Z de una célula Jurkat formando un conjugado con una células Raji pre-incubada con SEE y CMAC, teñidas con anticuerpos contra MHCII-B y CD3. Se observa la localización de la MHCII-B abrazando al complejo TCR/CD3. Barra de escala=10µm.

Experimentos anteriores del grupo habían demostrado que la localización preferencial de NMII-B en la zona posterior de las células migratorias actúa como señal anti-protrusiva (152). En este sentido, la localización de NMII-B en los bordes del contacto de la SI podría desempeñar un papel similar, limitando la protrusión de la célula T hacia la CPA, disminuyendo la polimerización local de actina. Para comprobar esta hipótesis, observamos la localización de un activador de Rac que se expresa de manera consistente en los linfocitos T, Vav1 acoplada a GFP, co-transfectada con mCherry-MHCII-B en células Jurkat. Las imágenes de tiempo retardado por microscopía Confocal revelan que Vav1 y NMII-B co-localizan en los contactos sinápticos de los linfocitos T (**Fig. 18A, flechas verdes, minutos 10-16**). Sin embargo, en las zonas de protrusión la proteína Vav1 se localiza justo delante de la NMII-B (**Fig. 18. flechas verdes, minutos 19-23**). Por el contrario, la aparición de NMII-B en la parte frontal de la protrusión denota una zona en la que protrusión se detiene (**Fig. 18A, flechas rojas contactos 1 y 2**) y/o se retrae (**Fig. 18A, contacto 2 minutos 27-30**). Estos datos sugieren que la NMII-B participa de manera esencial en la regulación de la profusión celular de los linfocitos T y tiene un papel esencial en la formación de los contactos celulares durante la SI.

Figura R18

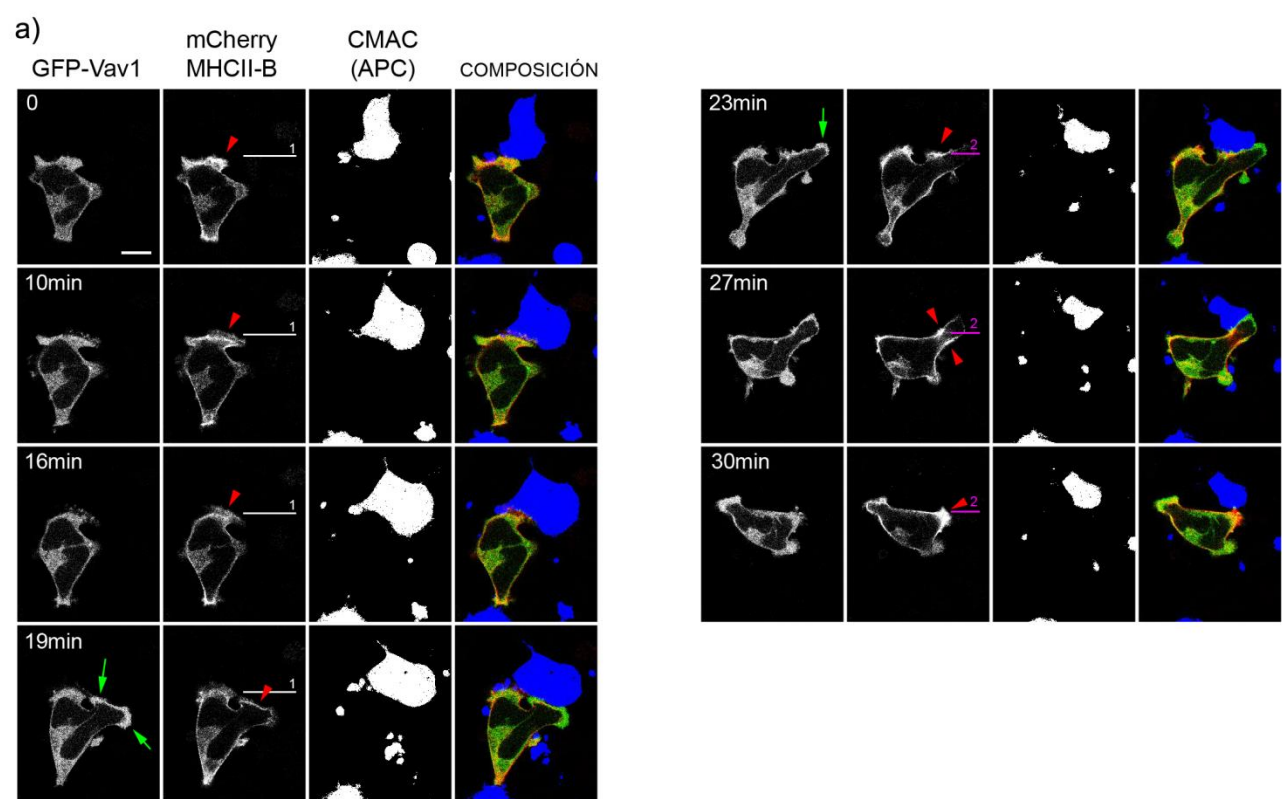


Figura R18. Localización de Vav1 y NMII-B en contactos inmunológicos durante los ciclos de protrusión y retracción.

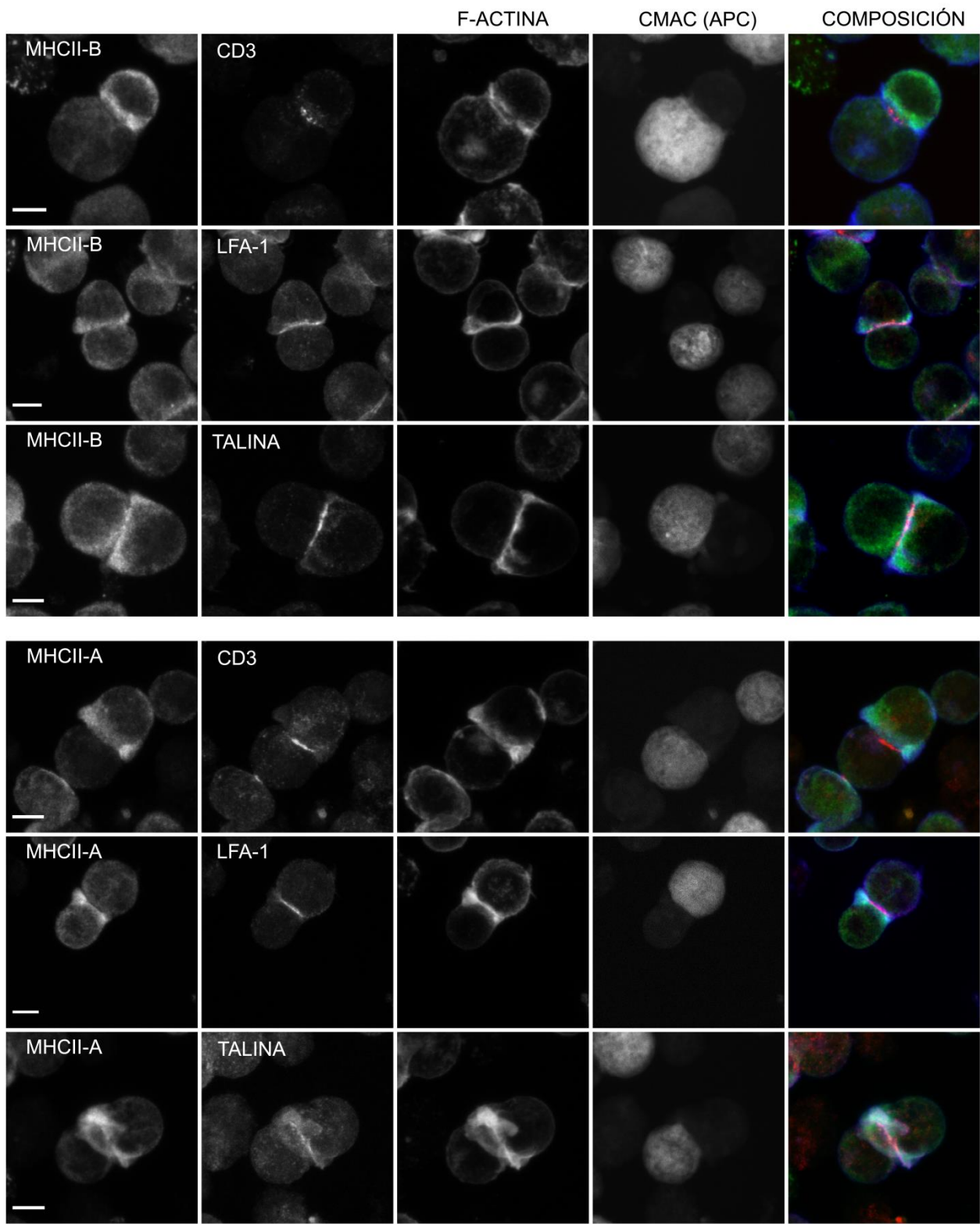
Secuencia de imágenes de tiempo retardado de microscopía Confocal de células Jurkat co-transfectadas con mCherry-MHCII-B y GFP-Vav1 formando conjugados con células Raji pre incubadas con SEE y CMAC. Durante los 30 min del vídeo, la célula Jurkat forma dos contactos sinápticos con la misma célula (marcados como 1 y 2), donde se observa la co-localización de Vav1 y NMII-B en el contacto sináptico (min 10-16) y la localización preferencial de Vav1 en la periferia de la zonas protrusivas de las células justo por delante de la MHCII-B (min 19-23). La posterior localización de la NMII-B correlaciona con la detención de la protrusión y la posterior retracción de esta región (min 27-30).

Para confirmar la implicación de la NMII-B en la limitación de la protrusión inducida por el contacto sináptico, silenciamos MHCII-B en células Jurkat y las enfrentamos a CPA (Raji+SEE). Estos experimentos se realizaron visualizando la localización espacial de diversos componentes de los complejos supramoleculares de activación, específicamente CD3 (cSMAC), LFA-1 y talina-1 (pSMAC). La observación de estos conjugados por microscopía Confocal reveló que las células T deplecionadas de NMII-B establecían unos contactos anormalmente extensos con las CPA comparados con las células control (**Figs.R19 y R20**). Como se ha descrito anteriormente, observamos que tanto NMII-A como NMII-B se disponían en los flancos del contacto sináptico en células control, mientras que CD3 definía el cSMAC y LFA-1 y talina definían un

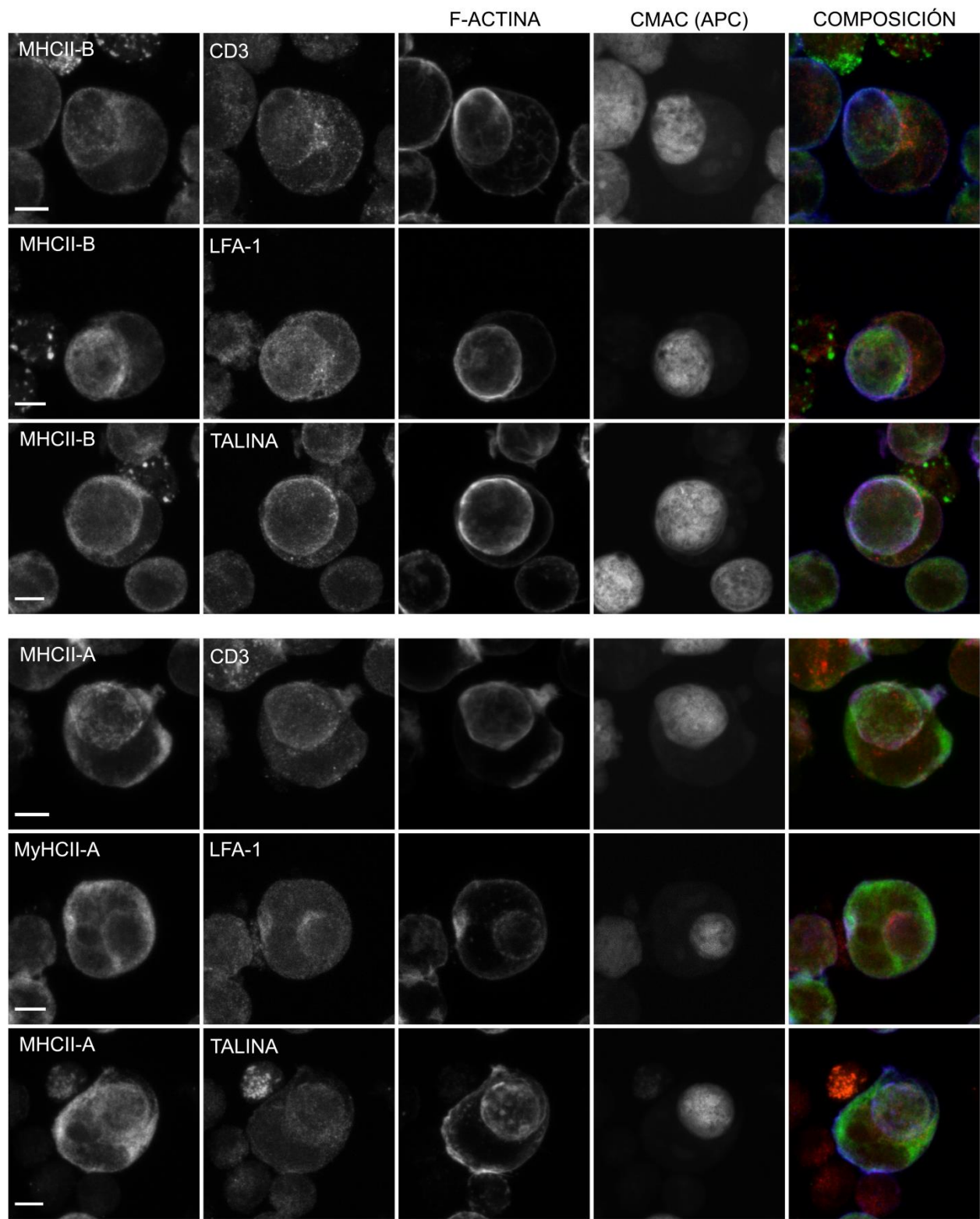
contacto longitudinalmente más largo que comprendía el cSMAC y el pSMAC (**Fig. R19A**). De forma similar a lo observado en superficies bidimensionales, la delección de MHCII-B previno la segregación molecular de CD3 al cSMAC y LFA-1/talina-1 al pSMAC (**Fig. R19B**). En las células silenciadas para MHCII-B, la MHCII-A no dejaba de expresarse, pero se localizaba homogéneamente, sin definir particularmente el contacto con la CPA (**Fig. R19B**). El efecto del silenciamiento era variable y probablemente dependiente de dosis, pero frecuentemente la célula T llegaba a envolver por completo a la CPA (**Fig. R20A-B**). Experimentos realizados mediante video-microscopía Confocal con células Jurkat co-transfectadas con siRNA contra MHCII-B y el marcador de actina LifeAct-GFP revelaron que las células T deplecionadas para MHCII-B perdían la inhibición por contacto, generando intensas olas de protrusión contra la superficie de la célula Raji (**Fig. R20B**), llegando a englobarla por completo. Este efecto era dependiente de la célula T, ya que el silenciamiento de MHCII-B en la célula Raji (CPA) no tuvo efecto en el contacto célula-célula (**Fig. R19C**).

Figura R19

a)



b)



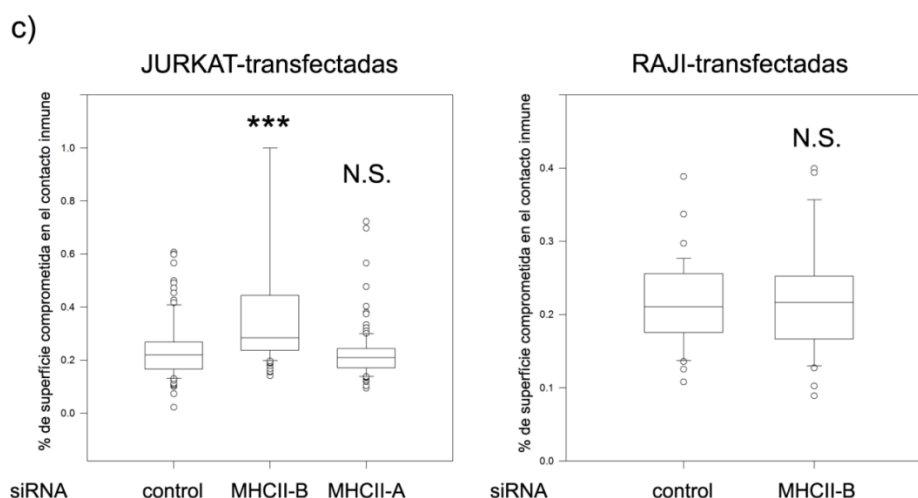


Figura R19.El silenciamiento específico de MHCII-B en las células T genera unos contactos aberrantemente extensos en la sinapsis inmune

a) Imágenes representativas de microscopía Confocal de células Jurkat no transfectadas formando conjugados con células Raji pre incubadas con SEE y CMAC durante 30 min. Las células se tiñeron para visualizar MHCII-B (paneles superiores), MHCII-A (paneles inferiores), CD3 LFA-1, talina y F-actina como se indica en la figura. Barra de escala=10 μ m.

b) Imágenes representativas de microscopía Confocal de células Jurkat silenciadas para MHCII-B formando conjugados con células Raji pre incubadas con SEE y CMAC durante 30 min. Las células se tiñeron para visualizar MHCII-B (paneles superiores), MHCII-A (paneles inferiores), CD3 LFA-1, talina y F-actina como se indica en la figura. Nótese la disminución de la expresión de MHCII-B en la célula T por comparación con el nivel de expresión de la célula Raji con la que forma el conjugado, comparado con los paneles que se muestran en (a). Barra de escala=10 μ m.

c) Cuantificación de la superficie de contacto entre las célula Jurkat y las células Raji utilizando para ello el cociente entre la longitud del contacto entre la célula Jurkat y la Raji, dividido por el total del perímetro de la célula Raji. N=450, *** $P < 0.001$ Kruskal-Wallis. A la derecha, se muestra la cuantificación del efecto de silenciar MHCII-B en la célula Raji y no en la Jurkat.

Figura 20

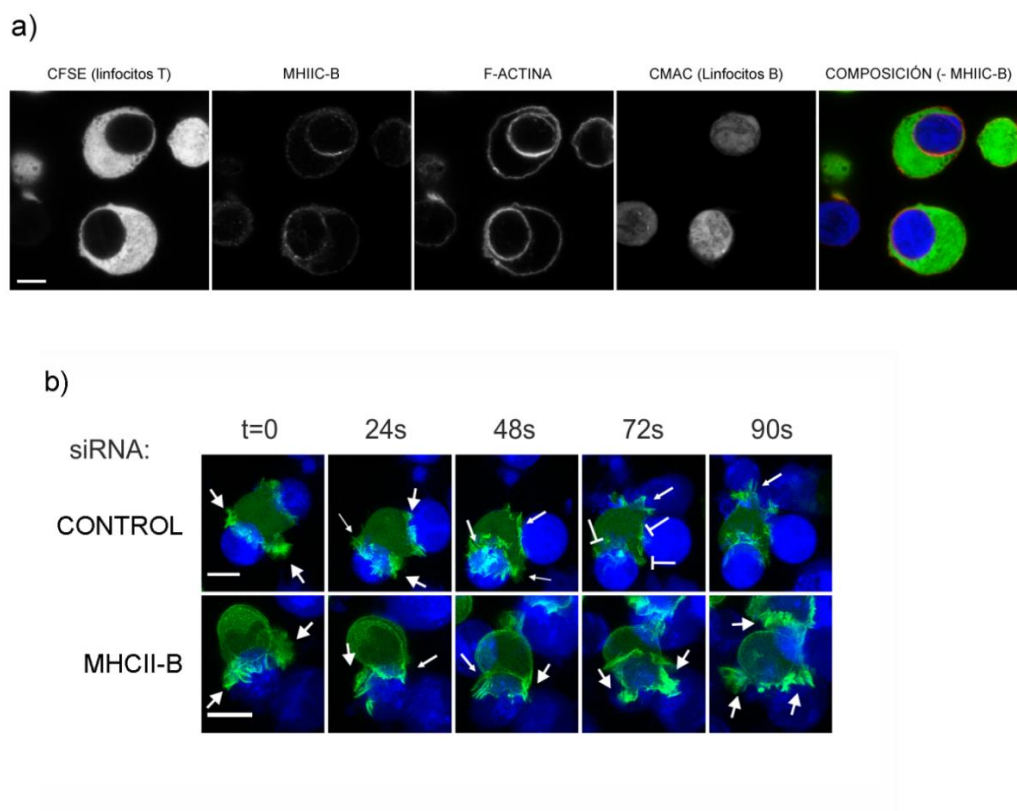


Figura R20.El silenciamiento específico de MHCII-B produce englobamientos completos de la célula CPA, por la célula T.

a) Imágenes representativas de microscopía Confocal de células Jurkat silenciadas para MHCII-B y pre incubadas con el marcador vital CFSE formando conjugados con células Raji pre incubadas con SEE y CMAC durante 30 min. Los conjugados se tiñeron con anticuerpos contra MHCII-B y faloidina. Barra de escala=5µm.

b) Secuencia de imágenes de microscopía Confocal de células Jurkat control (línea superior) o silenciadas para MHCII-B (línea inferior) formando conjugados con células Raji pre incubadas con SEE y marcadas con CMAC. Las flechas denotan protrusiones activas, más o menos intensas (denotado por el tamaño de las flechas), mientras que las barras cerradas denotan zonas en la que la protrusión se detiene por completo. Se puede observar como los conjugados entre Raji y células silenciadas para MHCII-B son mucho más activos en términos de protrusión de la célula T hacia la CPA. Barra de escala=10µm.

Adicionalmente, y para comprobar si podíamos observar la aparición de contactos exageradamente extendidos en linfocitos T primarios, realizamos experimentos en linfocitos T de sangre periférica de donantes sanos, pre-activados con SEE, durante 3 días (para enriquecer la fracción de linfocitos T $V\beta 8^+$), silenciando la expresión de MHCII-B y posteriormente reactivándolos de nuevo con SEE durante otros 3 días. Estas células formaban conjugados con células Raji preincubadas con SEE y CMAC. Observamos que, mientras la mayoría de los controles formaban sinapsis bien estructuradas en las que TCR Vb8 se localizaba definidamente en el centro

del contacto, las células deplecionadas de MHCII-B mostraban contactos exageradamente extendidos sobre la CPA y en los que el TCR no se congregaba mayoritariamente en la zona de contacto (**Fig. R21**).

Figura R21

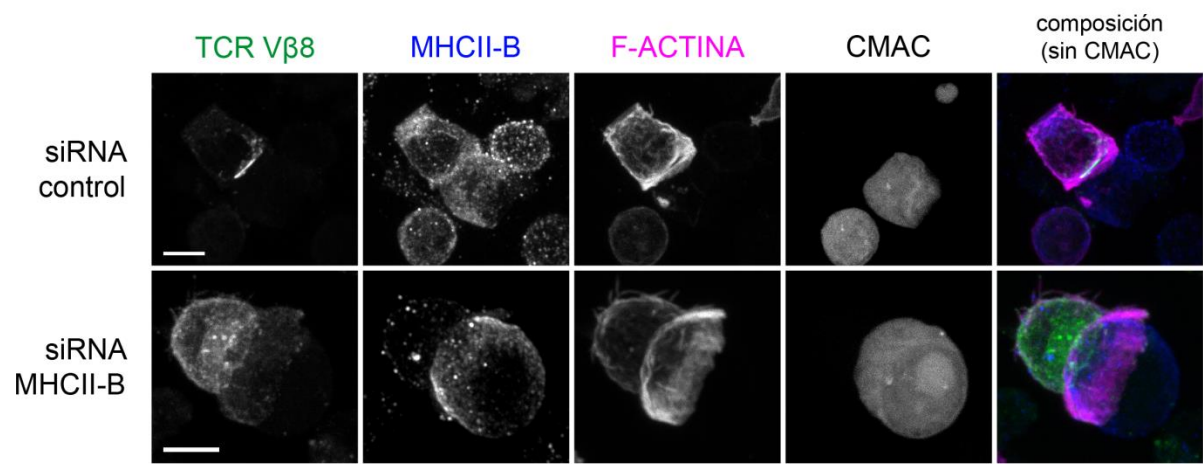


Figura R21.El silenciamiento específico de MHCII-B en linfoblastos T primarios induce la sobre-extensión de la zona de contacto y deslocaliza el complejo TCR:CD3.

Imágenes representativas de microscopía Confocal de linfoblastos T humanos incubados durante 3 días con SEE. Las células se transfectaron con siRNA control o siRNA contra MHCII-B y cultivados durante otros 3 días con el mismo tratamiento. Los linfoblastos se incubaron sobre poli-L-lisina con células Raji pre incubadas con SEE y CMAC durante 30 min. Finalmente, las células se tiñeron para visualizar MHCII-B, TCR Vβ8, y faloidina como se indica en la figura. Barra de escala=10 μm.

Estos datos, combinados con el papel de NMII-B como inhibidor de la protrusión en células mesenquimales (152) y en células sobre superficies 2D activadas con anti-CD3, indican que la NMII-B actúa como un “limitador” de la extensión de la zona de contacto entre la célula T y la CPA, participando en el confinamiento espacial de la zona de contacto T/ CPA, esto sugiere que NMII-B actúa como un optimizador clave de la activación de las células T mediante el establecimiento de sinapsis inmunológicas, cuando estas expresen esta isoforma a niveles elevados, por ejemplo en células leucémicas (Jurkat) o células de memoria (CD3+CD4+CD45RO+). Esto permite postular que la NMII-B es necesaria para la generación de una respuesta inmune decisiva frente a un patógeno, permitiendo la división rápida de la célula T en respuesta a la estimulación, así como la expresión de marcadores de activación y/o la secreción de citoquinas. Las células que contienen niveles bajos de NMII-B (células T naïve) aún podrían ejecutar la mayor parte de estas

funciones usando NMII-A, que bien es requerida a muy bajos niveles para su función (explicando los resultados con si/shRNA), bien desempeña funciones independientes de la contractilidad (en el caso de los tratamientos con blebbistatina). En este sentido, proponemos que la NMII-B optimiza la segregación molecular de los SMAC, que estarían bien definidos (sinapsis monocéntricas) en el caso de células que expresan altos niveles de MHCII-B (Jurkat, células de memoria), y menos definidos (sinapsis multicéntricas) en el caso de células que expresan niveles bajos de MHCII-B (células T naïve).

5. Discusión

Posible papel de NMII-B en la expansión clonal de los linfocitos T.

La expresión de las diferentes isoformas de la MHCII (que define los parálogos de NMII) en diferentes tejidos y células del organismo está relacionada con las diferencias de función de la NMII en cada uno de ellos. Esto depende en gran medida de su diferente capacidad de unión y generación de trabajo mecánico producido por el deslizamiento de los filamentos de actina en la célula respecto a la NMII. De acuerdo a la cinética de interacción actina-miosina determinada por el ciclo de hidrólisis de ATP (caracterizado como el tiempo transcurrido entre la entrada de una molécula de ATP y la siguiente), la NMII-B permanece más tiempo unida a la actina que la NMII-A (153). Por ello la NMII-B, es más eficaz que la NMII-A para generar estructuras que soporten tensión establemente, presentando por tanto una función más estructural. Por el contrario, el parálogo NMII-A se mantiene unido mucho menos tiempo a la actina, generando ciclos de trabajo de más corta duración, similares a los realizados por la miosina II muscular. Esto permite especular que las células y tejidos que no requieren la formación de estructuras estables no expresan NMII-B, o la expresan a muy bajos niveles, como por ejemplo plaquetas y neutrófilos. Existen algunos tejidos que no expresan *Myh10* y que sí requieren estructuras estables para su desempeño funcional, como las células que forman las estructuras vestibulares del oído. Estas células, sin embargo, expresan otra isoforma (*Myh14*, que define el parálogo NMII-C) que se une de manera más duradera que NMII-A a la actina (154), pudiendo compensar el efecto de esta ausencia.

Además de su papel en estructuras funcionalmente estables, la NMII-B también facilita la proliferación celular, ya que su eliminación previene la citoquinesis (155), induciendo la formación de células multinucleadas (96, 128). En las células hematopoyéticas, los requerimientos estructurales y de división celular son a su vez dependientes de la función de cada linaje, plaquetas, eritrocitos y neutrófilos no expresan MHCII-B de manera detectable, lo que concuerda con su incapacidad proliferativa y alta dinámica funcional. Por otra parte, la expresión de MHCII-B en células mononucleares humanas es variable en linfocitos T y B, monocitos y células NK (**Fig. R3**).

Un estudio previo describió que los linfocitos T de ratón de las cepas DO11.10 TCR (fondo genético BALB/c) o D10.G4-IL2 (fondo genético AKR/J) no expresan MHCII-B (111). Sin embargo, nuestros datos

indican que las células T de ratones C57BL/6N expresan MHCII-B de manera robusta en respuesta al tratamiento con IL-2, tanto por citometría de flujo (**Fig. R5E**) y validado por PCR (gen *MYH10*), aunque sí son negativas cuando las células no están estimuladas. Por otra parte, la línea leucémica de ratón EL4 (derivadas de la cepa C57BL/6N) también expresa MHCII-B (**Fig. R1C**). Es posible que esta disparidad de resultados se deba a diferencias en los niveles de expresión en las células T de distintas cepas (tanto por citometría de flujo o PCR semi-cuantitativa); diferencias en la afinidad de los anticuerpos usados en el estudio anteriormente referido y nuestros datos (citometría de flujo) y diferencias en la secuencia del cebador usado para detectar *MYH10* en el trabajo anteriormente citado, (155) que no refiere la secuencia utilizada.

La polarización de la miosina en la división celular, es un elemento fundamental, para la diferenciación celular de las células hijas y es esencial en la división asimétrica (156). Funcionalmente, el parólogo NMII-B es necesario para la proliferación de los progenitores hematopoyéticos CD34+, así como el mantenimiento de su capacidad pluripotencial (157). NMII-B participa en el mantenimiento de un contenido adecuado de ADN, ya que su inhibición (mediada por RUNX1) permite la poliploidía de los megacariocitos que precede a la formación de plaquetas maduras (158). Además, NMII-B media la enucleación de los eritrocitos durante su maduración (159). Funcionalmente, se puede postular que la NMII-B participa en los procesos de división de las células proliferativas (como los progenitores hematopoyéticos CD34⁺) y determina por tanto la asimetría de las divisiones de las células madre, que dan como resultado una célula madre y una célula en proceso de diferenciación terminal. Este proceso se relaciona con las divisiones asimétricas que generan eritrocitos y plaquetas maduros. Postulamos un modelo en el cual la distribución asimétrica de NMII-B determina la célula más “conservada”, que mantendría o preservaría el núcleo (en el caso de megacariocitos y eritroblastos), mientras que la NMII-A participaría activamente en el proceso de enucleación (línea eritroide) o la gemación de las plaquetas maduras (línea megacariocítica) (**Fig. D1**). Esta división se relaciona con la actividad funcional de ambas isoformas; mientras que la NMII-A es capaz de formar mini-filamentos activamente en localizaciones periféricas de la célula, la NMII-B está confinada a regiones más centrales, alrededor del núcleo (96, 160). De hecho la división asimétrica en respuesta a la activación antigénica del linfocito T, también se observa en los linfocitos T maduros para el mantenimiento de una célula hija conservada, pluripotencial y otra “comprometida” o efectora con un metabolismo y características propias (161). Con respecto al posible papel de la NMII-B en la división asimétrica, datos anteriores de nuestro laboratorio han

revelado que la NMII-B desempeña un papel fundamental en el posicionamiento del núcleo celular, ya que la inhibición de la expresión de MHCII-B resulta en la pérdida de anclaje y rotación espontánea del núcleo (96).

Figura discusión 1

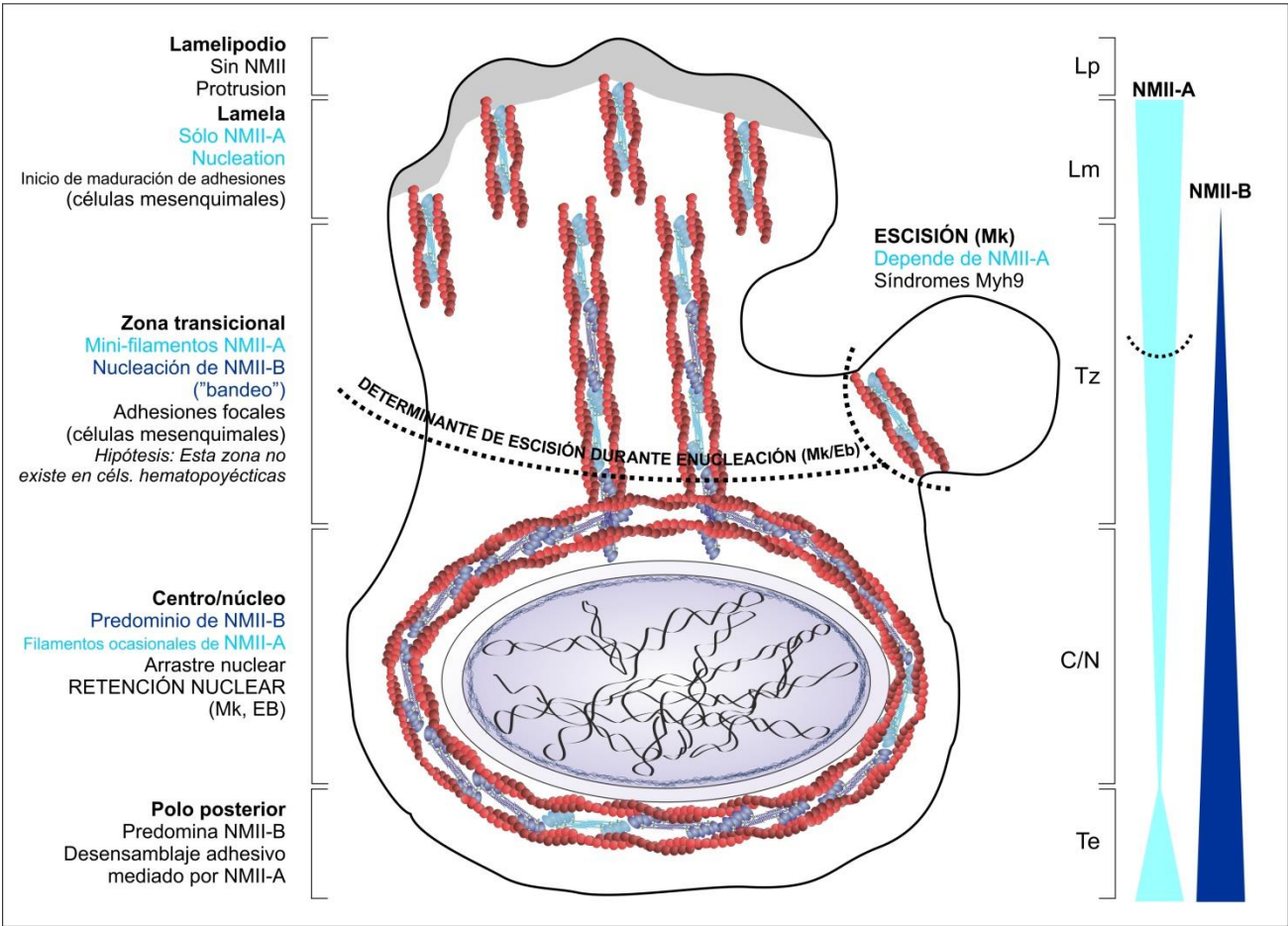


Figura D1. Distribución asimétrica de los parálogos de miosina II en la división celular de células del linaje hematopoyético.

El esquema incluye la localización dependiente de parálogo de la miosina II en la célula madre hematopoyética y cómo la formación de las diferentes células especializadas (en proceso de diferenciación terminal) y el mantenimiento de una célula madre pluripotencial que conserva su capacidad proliferativa es un reflejo funcional de una célula mesenquimal polarizada, en la cual la NMII-B, como proteína anti-protrusiva, permanece excluida del lamelipodio y la lamela, localizándose en la zona posterior de la célula y alrededor del núcleo. La NMII-A presenta una distribución bipolar, localizándose en la lamela donde participa en la protrusión y formación de adhesiones, y en la parte posterior de la célula.

Aunque la inhibición sistémica de la expresión de NMII-B causa letalidad embrionaria/perinatal (112), la mayor parte de los tipos celulares de los ratones afectados consiguen desarrollarse. La letalidad se debe principalmente a defectos en el desarrollo de los cardiomiocitos, el posicionamiento de la inserción aórtica y la integridad del septo ventricular, e hidrocefalia (162). Esto implica que la NMII-A es generalmente capaz de compensar la función de NMII-B, excepto en situaciones muy concretas, que incluyen el desarrollo embrionario del corazón (los cardiomiocitos de corazones adultos no expresan MHCII-B); la integridad de las

células del borde apical del canal espinal, y la generación de polaridad anteroposterior en células migratorias. A nivel de médula ósea, la eliminación de NMII-B causa que las divisiones asimétricas necesarias para el mantenimiento de las poblaciones pluripotenciales hematopoyéticas (CD34⁺) sean en muchos casos ineficaces, subrayando el papel esencial de la NMII-B en el mantenimiento de la pluripotencia (157).

En contrapunto, la deficiencia en NMII-A no parece ser compensada por NMII-B de una manera general. Los ratones deficientes en MHCII-A mueren a día embrionario E6.5 con pérdida de integridad de los epitelios primitivos que preceden a los procesos de organogénesis. Sin embargo, la función contráctil de NMII-A no es necesaria en todos los casos, o al menos existen fenómenos de compensación puntuales por la NMII-B, ya que los síndromes asociados a mutaciones con pérdida de función de MHCII-A (síndromes MYH9) sólo afectan a células y órganos que sólo expresan NMII-A, como los neutrófilos, las plaquetas y otros tipos celulares muy especializados, como células de los glomérulos renales y del oído interno (163). Esto determina que las células que expresan NMII-B utilizan la fuerza generada por este parálogo en los procesos morfogénicos que dependen de la generación de trabajo mecánico, como la migración y la división celular. En este contexto, la sustitución de la MHCII-A endógena con MHCII-A mutantes que causan enfermedad (por ejemplo N93K) rescatan la mayor parte de los defectos migratorios a nivel celular, excepto la retracción del polo posterior, que depende crucialmente de la NMII-A (Rocío Aguilar-Cuenca et al., manuscrito en revisión). En este contexto, el desarrollo hematopoyético es normal en los pacientes de estos síndromes, excepto la función de las plaquetas adultas (los síndromes MYH9 cursan siempre con megatrombocitopenia) y la aparición ocasional de inclusiones de Döhle en los neutrófilos (164). Sin embargo, estos pacientes no presentan deficiencias en los linfocitos T o B, probablemente debido a que estas poblaciones expresan NMII-B. Es interesante destacar que estos pacientes tampoco presentan defectos cardíacos, lo que significa que la función contráctil de la NMII-A no es indispensable para la generación de mioblastos embrionarios (que expresan NMII-B) o cardiomiocitos adultos (que expresan MII musculares).

Mientras que el parálogo NMII-B parece esencial en el mantenimiento de poblaciones hematopoyéticas pluri- o totipotenciales, su función en linajes diferenciados no está bien caracterizada. Los datos presentados en esta Tesis Doctoral indican que la expresión en linfocitos T no activados es consistentemente baja. Esto correlaciona con su incapacidad para proliferar en ausencia de señales mitogénicas. Por el contrario, el incremento en la expresión de MHCII-B en respuesta a anti-CD3, PHA-L y sobre todo IL-2 tanto en linfocitos

T humanos como murinos parece indicar que los linfocitos T podrían adquirir NMII-B para facilitar el proceso proliferativo en respuesta a señales mitogénicas, como un cebador de la capacidad proliferativa de las células y facilitando la conversión de células naïve en efectoras. En este sentido, NMII-B es necesario para la citoquinesis (100), tanto en ausencia como en presencia (96) del parólogo NMII-A. En este contexto, la NMII-B desempeñaría un papel fundamental en la separación de los núcleos durante la división, ya que la inhibición de su expresión causa multinucleación. La NMII-A realiza de una manera inapropiada esta función ya que la citoquinesis requiere la generación de una tensión continuada en el tiempo para la separación de los núcleos (165) y la escisión de la membrana de las células hijas (166). La NMII-A tiene un ciclo de unión a la actina corto y que no está afectado por la carga, con lo que no es un buen elemento de resistencia para la tensión mecánica, mientras que la NMII-B tiene un ciclo más largo y que aumenta con la carga (153), haciéndola un mejor elemento de resistencia de la tensión.

Además de su implicación en los procesos de proliferación, NMII-B podría desempeñar otros papeles en los linfocitos T, como dotar a las células de resistencia mecánica para su supervivencia en circulación. De acuerdo con esta posibilidad, NMII-B se recluta activamente a localizaciones en la célula sometidas a tensión, como la zona posterior de las células migratorias. En esta función, la NMII-B sería crucial para la integridad del córtex de actomiosina de los linfocitos T. En este sentido, nuestros datos han demostrado que la depleción de NMII-B disminuye la cantidad de actina polimerizada en los linfocitos T, y produce un “adelgazamiento” de la capa de actomiosina subcortical. Los linfocitos T de memoria ($CD45RO^+$) humanos expresan niveles consistentemente más elevados de NMII-B que los linfocitos T naïve ($CD45RA^+$), que correlaciona con un córtex de actina más denso (167). El estado del córtex de actina determina diferencias fenotípicas entre los linfocitos T naïve y memoria, como la susceptibilidad a la infección por HIV-1 (168). La base molecular de esta diferencia permanece inexplorada, pero podría estar relacionada con el efecto de las citoquinas que regulan la renovación y proliferación periférica de linfocitos T naïve y memoria. Los linfocitos T $CD45RA^+$ dependen de IL-7 para su renovación; los $CD45RO^+$ también requieren IL-7, pero los niveles de su receptor están controlados por la señalización vía IL-2 de forma que los linfocitos que expresan altos niveles de CD25 adquieren un fenotipo efector y de baja vida media, mientras que los que expresan niveles moderados de CD25 tienden a convertirse en células T memoria (137). Como hemos demostrado, la expresión de NMII-B se induce por exposición a IL-2 en células que expresan CD25 (activadas con anti-CD3 o PHA-L). La adquisición y retención de NMII-B podría ser un factor de supervivencia a largo plazo para estas células. Este

punto es controvertido, ya que existen estudios que sugieren que las células T de memoria son más duraderas en circulación que las naïve, mientras que otros estudios sugieren lo contrario (169). En cualquier caso, la adquisición de NMII-B podría ser un mecanismo presente en las células memoria para ejecutar una proliferación rápida en caso de “reencuentro” con el antígeno y/o la renovación de la población de linfocitos T memoria en homeostasis. Esta diferencia podría ser crucial para determinar el umbral de activación de los linfocitos T memoria vs naïve. Los linfocitos T de memoria se activan y proliferan en respuesta a menores concentraciones de antígeno (170), independientemente de la expresión de marcadores de activación en la membrana plasmática, que es muy similar o incluso más elevada en los linfocitos T naïve.

La mayor parte de los linfocitos T de memoria permanecen quiescentes en G₁, mientras que los linfocitos T naïve se encuentran en G₀, lo que se relaciona con la capacidad del linfocito T de memoria de proliferar más rápidamente, debido a que alcanza más rápido la fase S tras la activación del TCR (171). En este contexto, la NMII-B podría desempeñar un papel catalizador en la proliferación de los linfocitos T de memoria en respuesta a bajas concentraciones de antígeno.

Función de NMII-B en la migración y polaridad de linfocitos T

La migración leucocitaria está determinada por proteínas de adhesión al sustrato tales como integrinas (LFA-1) o selectinas (CD62L), otros receptores de membrana, mediadores de señalización y proteínas del citoesqueleto. Funcionalmente, los leucocitos migran de manera muy similar a la de las amebas, un organismo protista que se mueve emitiendo pseudópodos. Por ello, la migración basada en la formación de pseudópodos se denomina migración ameboide, para diferenciarla de otros tipos de migración celular como la de los fibroblastos, que se denomina migración mesenquimal. La migración ameboide se caracteriza por la formación de un polo anterior y un polo posterior (urópodo) y la ausencia de estructuras adhesivas estables, como adhesiones focales características de los fibroblastos y otros tipos mesenquimales (172)

El primer paso de la migración es la formación de un eje antero-posterior de polaridad, donde se distingue una zona frontal rica en actina que define la zona delantera o anterior de la célula que se denomina el frente de avance. Esta zona se caracteriza por la aparición de un lamelipodio que contiene actina ramificada, seguido por una zona en la que se acumula NMII-A inmediatamente anterior al núcleo. Tras el núcleo, el polo posterior o urópodo acumula actomiosina en el que se localizan tanto NMII-A como NMII-B, el aparato de

Golgi y el centro organizador de microtúbulos. A nivel de receptores, el frente de avance acumula integrinas y quimiorreceptores involucrados en la respuesta direccional a gradientes de quimiorreceptores (fundamentalmente quimioquinas). Por el contrario, en el urópodo se localizan diferentes proteínas de adhesión, incluyendo ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PSGL-1, CD43 y CD44 (173). Estas proteínas de membrana conectan con el citoesqueleto de actina a través de diversos adaptadores, algunos de los cuales pertenecen a la familia E/R/M (ezrina/radixina/moesina).

El eje de polaridad se define en respuesta a un gradiente extracelular que puede ser quimiotáctico (que promueve quimiotaxis), inmovilizado o soluble; haptotáctico; durotáctico; mecánico o dependiente de la reología del microentorno; o una combinación de dos o más de los anteriores. Estas señales promueven la adquisición del fenotipo polarizado descrito anteriormente en la dirección del movimiento hacia la mayor concentración de quimioatrayente (quimiotaxis) o estímulo adhesivo (haptotaxis); mayor rigidez (durotaxis); menor resistencia (mecanotaxis) o carga (electrotaxis). Si estos estímulos son isotrópicos (no direccionales), algunas células se polarizan anteroposteriormente, pero migran aleatoriamente, de manera no direccional. La definición de este tipo de movimiento reemplaza el sufijo “-taxis” con el sufijo “-cinesis”.

El origen de esta asimetría celular en respuesta a estimulación externa se basa en una polarización de la señalización que transforma el gradiente extracelular en un gradiente intracelular de señales. A continuación describimos algunas generalidades para el proceso de quimiotaxis, que es el mejor caracterizado. Los receptores de quimio-atrayentes son, en su mayor parte, receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G. La unión polarizada del ligando a estos receptores genera un desequilibrio en el número de receptores activados, mayor en la parte de la célula más cercana al origen del gradiente y menor en el polo opuesto. Esto genera un gradiente intracelular de señales que genera una polaridad intracelular. Algunas de estas señales son la unión de adaptadores de proteínas G (CRAC) y la generación de fosfolípidos bioactivos, por ejemplo PIP₃. Las células utilizan estas cascadas para amplificar pequeñas diferencias en la concentración a lo largo del eje mayor de la célula, permitiendo la respuesta migratoria hacia una diferencia del 2% de concentración del gradiente del frente al polo posterior.

La morfología de la célula polarizada se fundamenta en una asimetría en la configuración de los microfilamentos. Las señales quimiotácticas producen una polimerización ramificada de la actina producida

por los ejes de señalización Rac1/WAVE y Cdc42/WASP, que confluyen en la activación del complejo nucleador de actina Arp2/3 en el frente de avance. Esto permite la generación del lamelipodio. Por el contrario, la activación del eje RhoA/ROCK en el polo posterior activa la NMII y genera haces de actomiosina que definen el urópodo celular.

El mantenimiento de la morfología polarizada y el movimiento hacia el gradiente requiere un aporte de señal extracelular que se convierte en polimerización localizada de actina en el frente de avance. Es importante recalcar que la polimerización de actina, per se, no es suficiente para generar movimiento. Por el contrario, la polimerización de actina requiere un anclaje al medio extracelular, dependiente de integrinas o de confinamiento espacial en el caso de la migración ameboide (173) que permite la generación de tracción para mover el cuerpo celular incluido el núcleo. De manera simultánea, el polo posterior debe liberarse (“despegarse”) del micro-entorno para preservar la integridad de la célula. Este ciclo de adhesión del frente/ liberación del polo posterior está controlado globalmente por la integración de las señales químicas y mecánicas que recibe la célula y requiere una renovación de los componentes que median el proceso, mientras otros componentes no renovables determinan la forma celular. En este sentido, las integrinas que mantienen la adhesión están sujetas a un ciclo de internalización/ reciclaje que potencialmente mantiene este ciclo, con internalización en la parte posterior y reciclaje por el flujo anterógrado al frente de la célula (174).

A nivel morfológico, la asimetría causada por la diferente estructura de los microfilamentos se refleja en una asimetría dinámica, funcional y de composición. Los filamentos de actina dendrítica del lamelipodio se renuevan constantemente, con una vida media corta similar a la de los contactos adhesivos que se forman en esta región (<120s) (147, 175). Por el contrario, los filamentos que definen el urópodo tienen una vida media mucho más larga, lo que sugiere mecanismos adicionales de mantenimiento de la estructura. La acumulación de NMII-B en esta estructura podría participar en el mantenimiento continuado de los filamentos localizados en la zona posterior generando una estructura que mantendría la fisionomía del polo posterior constante pero permitiendo a su vez el intercambio de la actina. Nuestro grupo ha descrito previamente esta misma función para NMII-B en la determinación de polaridad antero-posterior en células mesenquimales (115), así mismo la localización en la zona posterior de la NMII-B puede ser clave para la translocación del núcleo en la migración (143).

Por el contrario, la NMII-A se localiza de manera bipolar en la célula migratoria, lo que sugiere que NMII-A contribuye a la estabilidad de los filamentos que definen el urópodo; pero además también participa en la generación de tracción en el frente de avance. De acuerdo con estas posibles funciones, la inhibición de la expresión de NMII-B debería bloquear la adquisición de un fenotipo polarizado, lo cual observamos utilizando siRNA contra *MYH10*. Por el contrario, la inhibición de NMII-A podría no tener un efecto morfológico en la polaridad, ya que NMII-B aún podría sustentar el urópodo, mientras que el frente de avance (definido como el lamelipodio) no requiere la contribución de NMII. Esto requiere la capacidad de la NMII-B de ensamblarse cuando NMII-A se expresa en cantidades reducidas (o no se expresa), lo que sugiere que la jerarquización que se observa en el ensamblaje de fibras de tensión en células mesenquimales (152) no se produce en el caso de las fibras que definen el urópodo. Además, esta observación sugiere que la NMII en el urópodo podría no estar sometida a tensión. Por tanto en este modelo la jerarquización de los dos parálogos no sería fundamental para que pudieran ejercer sus funciones, al contrario que ocurre en células mesenquimales.

De acuerdo con estas observaciones, las células deplecionadas de NMII-B no deberían migrar eficientemente en respuesta a quimioatrayentes, ya que su capacidad para polarizarse estaría disminuida. Esta hipótesis se vio confirmada en experimentos de migración a través de poro en cámaras de Boyden modificadas. Por otra parte, las células deplecionadas de NMII-A también deberían migrar deficientemente, ya que la capacidad de cambiar de morfología en respuesta a constricciones extracelulares (como un poro) depende de la NMII-A (109). Sin embargo, nuestros datos sugieren una tendencia no significativa en este sentido. Es probable que estos datos se relacionen con el nivel de inhibición de las distintas isoformas de MHCII. Aunque no se pueden extraer conclusiones cuantitativas utilizando anticuerpos policlonales diferentes contra las isoformas II-A y II-B, experimentos previos de nuestro grupo determinaron que la señales observadas en experimentos de Western Blot e inmunofluorescencia correlacionan razonablemente bien con los niveles absolutos de proteína medidos por espectrometría de masas en células CHO.K1 (143). Esto sugiere dos posibilidades: 1) la inhibición de NMII-A es menos eficiente que la de NMII-B, lo que resultaría en células “menos deplecionadas” de NMII-A; 2) el mantenimiento de niveles normales de NMII-B es más crucial para la aparición de un fenotipo que NMII-A. Es probable que ambas posibilidades sean correctas. En el caso de la segunda, nuestro grupo ha observado que el fenotipo no polarizado (índice de polaridad $\rightarrow 1$) causado por la depleción de NMII-B es evidente cuando se inhibe $\geq 50\%$ de MHCII-B, mientras que la depleción de NMII-A

es completamente dosimétrica (por ejemplo, un 80% de inhibición de la expresión hace que las células produzcan un 20% de fibras comparado con el control). En este supuesto, los experimentos usando siRNA siempre dejan una cantidad residual de NMII-A que podría ser suficiente para mantener la capacidad migratoria de las células en los ensayos de cámara de Boyden. En cualquier caso, ni siquiera las células en las que no se expresa NMII-A exhiben un 100% de inhibición. Por el contrario, un 60% de células T de ratones MyoIIA^{FLOX/FLOX} migran hacia la quimioquina CCL21 en ensayos de Transwell (109). Por otra parte, los niveles elevados de NMII-B en los linfocitos T de memoria podrían relacionarse con la mayor capacidad migratoria de los mismos comparados con células T naïve, al menos en respuesta a CXCL12. Aunque ambas subpoblaciones expresan niveles similares del receptor CXCR4 en membrana, los linfocitos T de memoria son 10 veces más sensibles en respuesta a CXCL12 que los linfocitos T naïve (167). La base molecular de esta diferencia no está bien definida, pero la NMII-B podría desempeñar un papel amplificador de la respuesta a la quimioquina, determinando una polarización más eficiente en respuesta a gradientes de menor concentración.

NMII-B en la arquitectura de la sinapsis.

La interacción de linfocitos T naïve con células presentadoras de antígeno (CPA) en los ganglios, o de linfocitos T de memoria con CPA en periferia produce la activación del linfocito T a través de un proceso de contacto físico entre las dos células, denominado sinapsis inmune. Este proceso guarda algunas semejanzas con la polarización migratoria, que la antecede. De hecho, el establecimiento de una arquitectura migratoria en los linfocitos T favorece la interacción de los linfocitos T con diferentes CPA (176). Durante las fases iniciales del contacto entre el linfocito T migratorios y la CPA, la activación polarizada de los complejos TCR/CD3 induce la disolución del urópodo y la redistribución de moléculas de membrana y componentes de señalización y del citoesqueleto. Estas interacciones iniciales se denominan kinapsis, en las que las proteínas implicadas en la activación del linfocito T comienzan a segregarse formando microdominios de membrana composicionalmente análogos a los observados en las sinapsis maduras, aunque no radialmente simétricos (177).

Esta segregación en sinapsis maduras requiere la consolidación del contacto adhesivo entre el linfocito T y la CPA, que depende de la señalización vía TCR/CD3 así como integrinas y la redistribución de los microfilamentos que regulan la incorporación de moléculas adicionales que median la interacción entre las

dos células, así como la exclusión de moléculas inhibitorias y/o estéricamente incompatibles con la distancia entre membranas. Durante esta consolidación, existe un proceso activo de polimerización de actina en la zona de contacto, acompañada por una redistribución de algunos de los componentes del urópodo, que se localizan en la zona de contacto, por ejemplo ICAM-3 (13).

Es fácil comprender que la formación de la sinapsis inmune es un proceso adhesivo que además conlleva una interacción mecánica entre el linfocito T y la CPA. Esta interacción mecánica promueve el establecimiento de un balance de fuerzas entre ambas células, cuyo punto de equilibrio es la sinapsis madura. Por parte de la célula T, existe un componente de empuje (hacia la CPA) generado por la polimerización localizada de la actina (es decir, la protrusión) y el desplazamiento de las moléculas del urópodo, que podría depender de la contracción de la actomiosina; y un componente negativo, que depende de la resistencia del córtex a la protrusión. En este proceso, se postula que la CPA desempeña un papel pasivo, oponiendo resistencia a la protrusión de la célula T. Atendiendo a los principios generales que rigen la durotaxis, la célula T ejercerá más fuerza cuanto mayor sea la resistencia mecánica ejercida por la CPA. Esta resistencia dependerá de la superficie de contacto y las propiedades mecánicas de la CPA, es decir dependiente de su córtex. En este sentido, una mayor superficie de contacto entre las dos células afectará a la tensión entre las dos células de dos maneras: por una parte, una mayor superficie disipará parte de la tensión; sin embargo, esto sólo es cierto si la avidéz adhesiva de la membrana permanece constante, lo que no es cierto en este caso ya que existe un aporte de integrinas y otros receptores adhesivos hacia la zona de contacto que aumenta localmente la avidéz. Además, una mayor rigidez de la CPA activará mejor a las integrinas del linfocito T. Este último aspecto se debe a la propiedad de las integrinas de activarse bajo tensión mecánica (178) , que depende de la extensión conformacional de la misma (179) así como del despliegue conformacional de adaptadores de señalización por integrinas como talina (22, 138).

De acuerdo con los razonamientos anteriores, la NMII tendría un papel en el balance de fuerzas mediado por los microfilamentos en la sinapsis inmunológica. Estudios anteriores han asignado un papel inexistente (111) o menor a la NMII-A (47) en la formación de la sinapsis. En concreto, experimentos realizados con siRNA contra MHCII-A o con blebbistatina demostraron un papel para la NMII-A en el reagrupamiento de los receptores o las moléculas de señalización presentes en los linfocitos T que, sin embargo, tenían un efecto modesto en la activación del linfocito T (47). Experimentos realizados en ratones deficientes para MHCII-A

en linaje linfoide presentaban defectos en la recirculación y navegación intranodal de los linfocitos T así como un tiempo de contacto con las CPA más elevado (110). Los experimentos descritos sugieren que la NMII-A no es un factor esencial en la activación de los linfocitos T. Sin embargo, nuestros experimentos usando siRNA para *MYH10* (MHCII-B) han revelado un papel fundamental para la NMII-B en la arquitectura del contacto. En primer lugar, nuestros datos indican que las células deficientes en NMII-B envuelven a las CPA, en vez de presentar zonas de contacto bien delimitadas. Dado que NMII-B se localiza fundamentalmente en los límites del contacto, podemos especular que la función de NMII-B es limitar la extensión del contacto durante su formación. Esta especulación tiene varios precedentes que le dan credibilidad: en primer lugar, neuronas de hipocampo en las que se ha deletado NMII-B presentan espinas dendríticas aberrantemente largas, lo que indica que NMII-B limita el crecimiento del contacto sináptico en el modelo neuronal (118). Por otra parte, la extensión del contacto entre la célula T y la CPA depende de la protrusión de la célula T, que a su vez depende de polimerización localizada de actina. Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que la NMII-B actúa como factor anti-protrusivo en células mesenquimales, limitando la localización de activadores de la polimerización (por ejemplo, activadores de Rac1) en la membrana (152). Por todo ello, nuestros datos son compatibles con un modelo por el cual el transporte progresivo de NMII-B desde el urópodo a la zona de contacto actúa como un temporizador y delimitador del contacto. Cuando la concentración de NMII-B en los laterales del contacto llega a un punto crítico, se detendría la protrusión, consolidando la zona de contacto y permitiendo la continuación normal del proceso de activación del linfocito T. Por este motivo, no se observa una concentración de receptores en los linfocitos T deficientes en NMII-B, que requiere la consolidación de la zona de contacto. Por el contrario, tanto CD3 como LFA-1 aparecen rodeando a la CPA en células englobadas, lo que sugiere que la translocación al contacto no depende de NMII-B, pero sí su confinamiento espacio temporal (**Fig. D2**).

Figura discusión 2

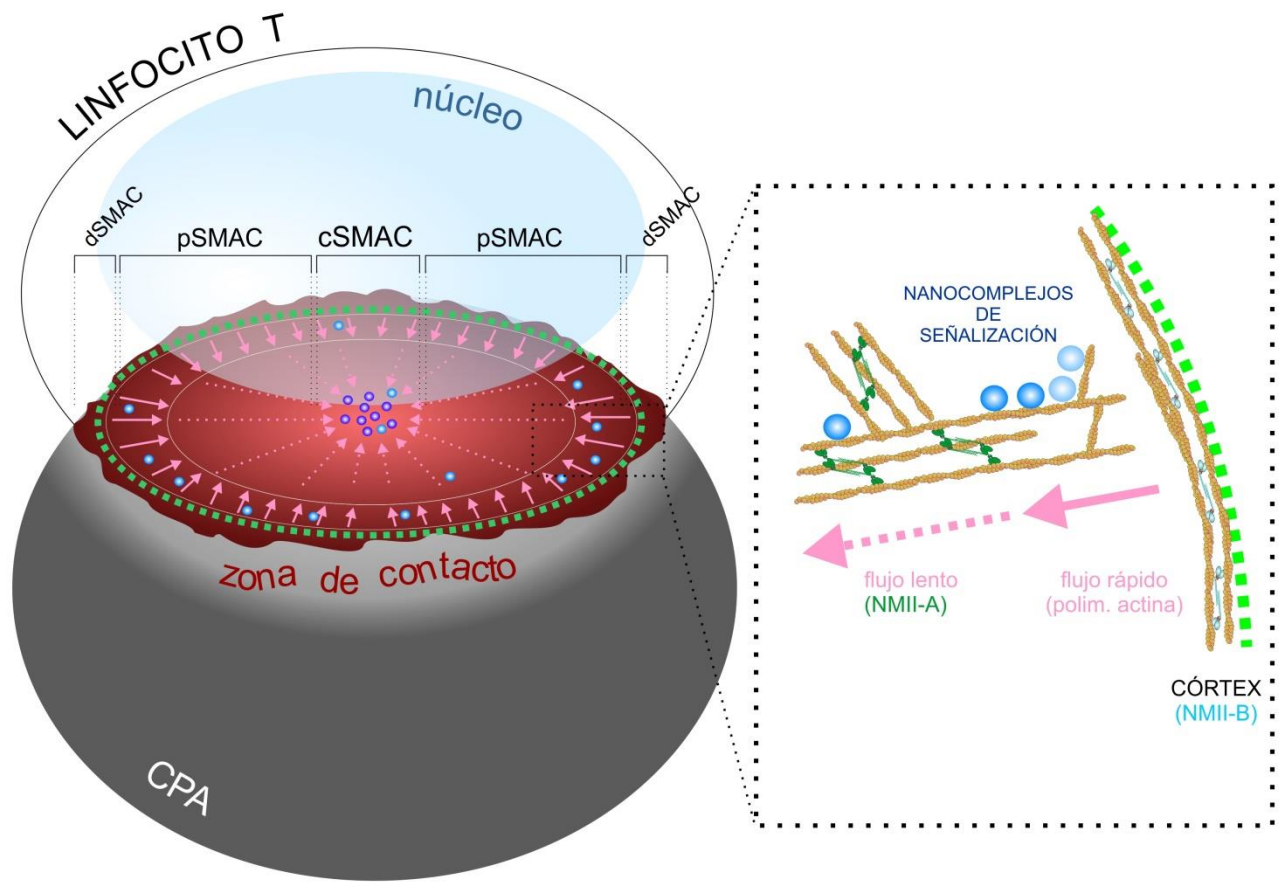


Figura D2. Modelo propuesto del papel de los parálogos NMII-A y NMII-B en la sinapsis inmune.

La fuerza mecánica ejercida por la NMII-A sobre el filamento de actina en conjunción con la adición de nuevos monómeros de actina permiten el deslizamiento de los filamentos de actina lo que a su vez provoca la contracción de la red, esto proporciona una fuerza de tracción que estabiliza la estructura de la sinapsis y mantiene la simetría radial. La NMII-B se localiza fundamentalmente en la periferia del contacto en el dSMAC podemos especular que la función de NMII-B es limitar la extensión del contacto durante su formación, consolidando la zona de contacto y permitiendo la continuación normal del proceso de activación del linfocito T, manteniendo la correcta arquitectura del contacto y del córtex de la NMII-B.

En el contexto de este modelo, mostrado en la **Fig. D3**, los datos obtenidos con siRNA de *MYH9* (NMII-A) o blebistatina (111) (que inhibe NMII-A y NMII-B simultáneamente) se pueden explicar de varias maneras: en primer lugar, los efectos del siRNA contra *MYH9* podrían ser dosimétricos, como se ha discutido anteriormente, es decir, que los niveles de inhibición no sean suficientes para causar un fenotipo detectable. Por otra parte, la blebistatina inhibe los dos parálogos de NMII de la célula T, pero también de la CPA, lo también inhibiría la rigidez de la membrana de la CPA. Esta es necesaria para una correcta activación mecánica de las integrinas de la célula T. Sin embargo, la concentración localizada de receptor (integrina en la célula T) y ligando (ICAMs en la CPA) podría producir una activación incompleta de las integrinas, suficiente para generar sinapsis aparentemente normales, pero de activación mecánicamente deficiente, lo que resultaría

en una activación ineficiente de la célula T. Este modelo también asume una activación independiente de NMII-A y NMII-B, que no ocurre en el caso de las fibras de tensión mesenquimales(152), pero no se ha tratado en el caso de fibras corticales en células hematopoyéticas.

Es importante destacar que el confinamiento de la señalización mediado por la reagrupación de receptores y mediadores no parece desempeñar un papel esencial en la señalización, sino en la terminación de la señal, que está relacionada con la terminación de la señal debido a la presencia de proteínas de internalización de la señal y otras proteínas inhibitorias como fosfatasas en el cSMAC (180). En este sentido, los nanocomplejos del complejo TCR son más activos en regiones periféricas (pSMAC) y mantienen su señalización durante más tiempo. En estas regiones, el flujo de F-actina es más elevado y podría favorecer el mantenimiento de la activación de los microdominios de TCR preservando su fosforilación. Por el contrario, los grupos de TCR que son transportados al cSMAC tienden a defosforilarse (181). El mecanismo no está bien determinado, pero se puede especular que depende de la interacción localizada con fosfatasas concentradas en el cSMAC, que está favorecida por un régimen de actina casi inexistente que inmovilizaría enzima (fosfatasa) y sustrato (TCR/CD3) en proximidad mutua. Estos datos permiten asignar un papel espaciotemporalmente restringido a la actina en la activación vía TCR/CD3. Por una parte, la polimerización protrusiva genera regímenes de flujo elevado en la periferia que mantendría un alto estado de activación durante las primeras fases del contacto (182). A medida que el proceso se consolida, la señalización sería atenuada por la disminución de la protrusión (mediada por NMII-B) que disminuiría el flujo y aumentaría la acumulación central de las moléculas señalizadoras, promoviendo su inactivación. En este proceso, la NMII-A participaría en el transporte activo de los grupos de señalización desde la periferia hacia el centro, mientras que NMII-B confinaría la zona de contacto (**Fig. D3**).

Figura Discusión 3

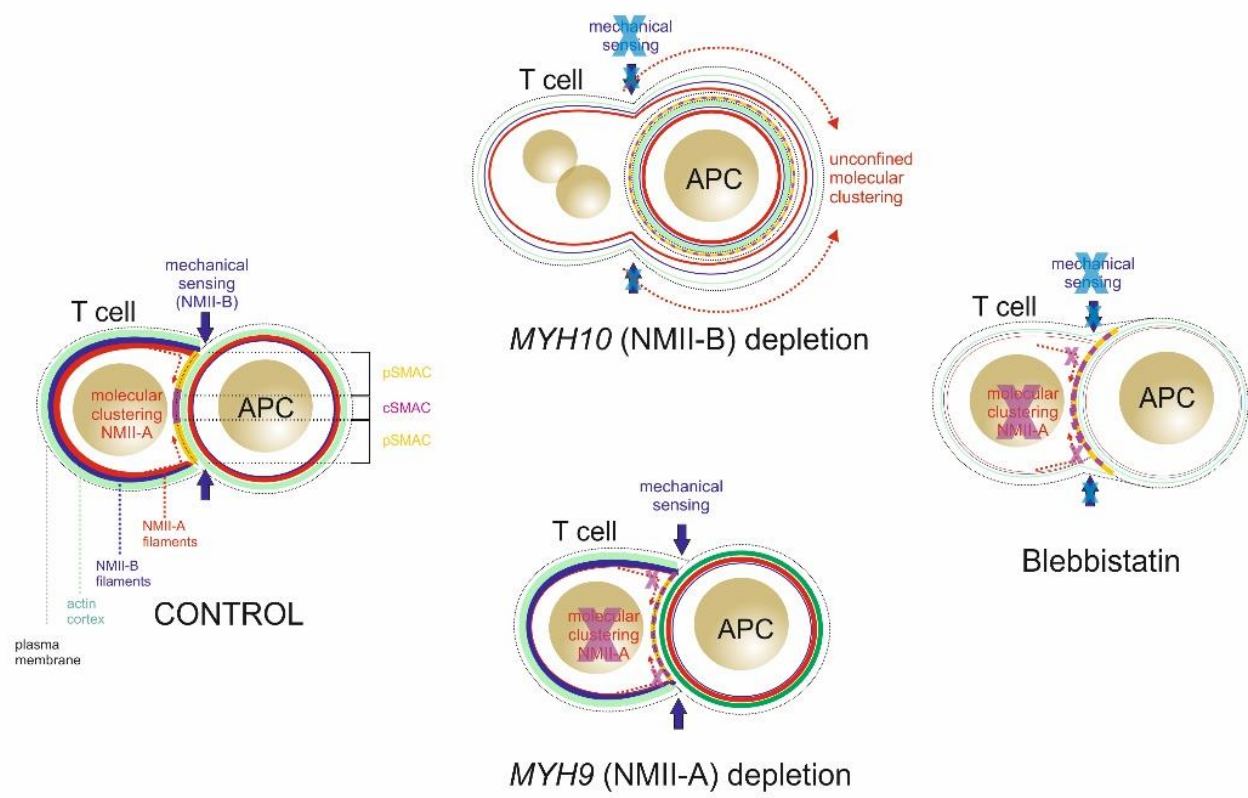


Figura D3. Efecto del silenciamiento específico de los parálogos NMII-A y NMII-B en la sinapsis inmune.

En la condición de control, figura izquierda, postulamos que la NMII-B tiene una función de anclaje y de inhibición de la protrusión (confinamiento del contacto) que depende de las fuerzas mecánicas establecidas entre las dos células durante la sinapsis inmune. Por otra parte, la NMII-A participa en el flujo de la actina desde la periferia hacia el centro del contacto que conlleva el desplazamiento de los microdominios TCR/CD3. En la condición de silenciamiento de la NMII-B (figura superior columna central) la célula T pierde la capacidad de confinar la sinapsis, y la fuerza protrusiva generada por la célula T sobre la CPA produce un aumento de la superficie de contacto de la célula T respecto a la célula CPA, llegándose a generar eventos de envoltura completa de la CPA. En los experimentos de Ilani, 2009 (figura inferior, columna central) el silenciamiento específico de NMII-A produce sinapsis normales, en los cuales está afectada la señalización del linfocito T debido a la ausencia de un flujo de actina adecuado, por lo cual se pierde la capacidad de formar el cSMAC, pero la arquitectura de la sinapsis es correcta, debido a que la NMII-B es capaz de ejercer su función de manera independiente a la NMII-A. En la figura derecha el tratamiento con blebbistatina, un inhibidor de la actividad ATPasa de la NMII-B y por tanto de su actividad mecánica, genera sinapsis menos eficaces pero no se observan fenómenos de envoltura debido al bloqueo de la diferencia de rigidez entre las dos células.

6. Conclusiones

Los hallazgos presentados anteriormente nos permiten concluir que:

1. NMII-B se expresa en líneas celulares de origen T y en células del linaje T y monocitos de donantes sanos.
2. Los linfocitos T $CD4^+ CD45RO^+$ de memoria presentan mayores niveles de expresión de NMII-B basal que los linfocitos T naïve $CD4^+CD45 RA^+$.
3. NMII-B se induce a través de estímulos mitogénicos (fitohemaglutinina e IL-2) e inmunogénicos (estimulación del complejo TCR/CD3) en linfocitos tanto humanos como murinos.
4. NMII-B participa en la polarización espontánea de los linfocitos T y en la migración eficaz a través de membranas semipermeables en respuesta a CXCL12.
5. La NMII-B del linfocito T regula la arquitectura de la sinapsis inmune, limitando la protrusión producida por la señalización inducida durante el contacto entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno y dirigiendo el posicionamiento sub-celular de receptores y moléculas implicadas en la activación sináptica del linfocito T.
6. NMII-B es necesaria para una óptima activación de los linfocitos T, tanto a nivel de señales proximales, como la fosforilación del complejo CD3, como a nivel de inducción de receptores de activación como CD69.

7. Referencias

1. Norcross MA. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Annales d'immunologie*. 1984;135D(2):113-34.
2. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76(2):241-51.
3. Wakimoto T, Egami Y, Nakashima Y, Wakimoto Y, Mori T, Awakawa T, et al. Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nature chemical biology*. 2014;10(8):648-55.
4. Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395(6697):82-6.
5. Campanero MR, Sanchez-Mateos P, del Pozo MA, Sanchez-Madrid F. ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J Cell Biol*. 1994;127(3):867-78.
6. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):557-69.
7. Gao GF, Jakobsen BK. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunology today*. 2000;21(12):630-6.
8. Dustin ML. Hunter to gatherer and back: immunological synapses and kinapses as variations on the theme of amoeboid locomotion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24:577-96.
9. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Analysis of microRNA and protein transfer by exosomes during an immune synapse. *Methods Mol Biol*. 2013;1024:41-51.
10. Dustin ML, Depoil D. New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):672-84.
11. Grigorian A, Torossian S, Demetriou M. T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol Rev*. 2009;230(1):232-46.
12. Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, et al. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol*. 2005;6(5):465-71.
13. Montoya MC, Sancho D, Bonello G, Collette Y, Langlet C, He HT, et al. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol*. 2002;3(2):159-68.

14. Irvine DJ, Hue KA, Mayes AM, Griffith LG. Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands. *Biophys J*. 2002;82(1 Pt 1):120-32.
15. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.
16. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
17. Walker A, Su H, Conti MA, Harb N, Adelstein RS, Sato N. Non-muscle myosin II regulates survival threshold of pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2010;1:71.
18. Smoligovets AA, Smith AW, Wu HJ, Petit RS, Groves JT. Characterization of dynamic actin associations with T-cell receptor microclusters in primary T cells. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 3):735-42.
19. Ohgushi M, Minaguchi M, Sasai Y. Rho-Signaling-Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Cell stem cell*. 2015;17(4):448-61.
20. Gil D, Schamel WW, Montoya M, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*. 2002;109(7):901-12.
21. Yokosuka T, Sakata-Sogawa K, Kobayashi W, Hiroshima M, Hashimoto-Tane A, Tokunaga M, et al. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1253-62.
22. Chung IM, Rajakumar G. Genetics of Congenital Heart Defects: The NKX2-5 Gene, a Key Player. *Genes*. 2016;7(2).
23. Bunnell SC, Kapoor V, Tribble RP, Zhang W, Samelson LE. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 2001;14(3):315-29.
24. Mittelbrunn M, Yanez-Mo M, Sancho D, Ursa A, Sanchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol*. 2002;169(12):6691-5.
25. Molnar E, Swamy M, Holzer M, Beck-Garcia K, Worch R, Thiele C, et al. Cholesterol and sphingomyelin drive ligand-independent T-cell antigen receptor nanoclustering. *J Biol Chem*. 2012;287(51):42664-74.

26. Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett.* 2010;584(24):4865-71.
27. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity.* 2004;21(3):401-13.
28. Dustin ML, Groves JT. Receptor signaling clusters in the immune synapse. *Annu Rev Biophys.* 2012;41:543-56.
29. Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, Dieckmann NM, Chen BC, Gawden-Bone C, et al. Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity.* 2015;42(5):864-76.
30. Ma X, Adelstein RS. The role of vertebrate nonmuscle Myosin II in development and human disease. *Bioarchitecture.* 2014;4(3):88-102.
31. Ingber DE, Wang N, Stamenovic D. Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Rep Prog Phys.* 2014;77(4):046603.
32. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):288-300.
33. Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH. RIAM activates integrins by linking talin to ras GTPase membrane-targeting sequences. *J Biol Chem.* 2009;284(8):5119-27.
34. Hogg N, Patzak I, Willenbrock F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):416-26.
35. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(7):546-59.
36. Obino D, Farina F, Malbec O, Saez PJ, Maurin M, Gaillard J, et al. Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. *Nat Commun.* 2016;7:10969.
37. Donnelly SK, Weisswange I, Zettl M, Way M. WIP provides an essential link between Nck and N-WASP during Arp2/3-dependent actin polymerization. *Curr Biol.* 2013;23(11):999-1006.
38. Labno CM, Lewis CM, You D, Leung DW, Takesono A, Kamberos N, et al. Itk functions to control actin polymerization at the immune synapse through localized activation of Cdc42 and WASP. *Curr Biol.* 2003;13(18):1619-24.

39. Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2010;24(11):1106-18.
40. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-312.
41. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6181-6.
42. Vicente Lopez MA, Vazquez Garcia MN, Entrena A, Olmedillas Lopez S, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D, et al. Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem cells and development.* 2011;20(6):1011-9.
43. Notarangelo LD, Ochs HD. Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):585-91.
44. Dupre L, Aiuti A, Trifari S, Martino S, Saracco P, Bordignon C, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity.* 2002;17(2):157-66.
45. Shu S, Liu X, Korn ED. Blebbistatin and blebbistatin-inactivated myosin II inhibit myosin II-independent processes in *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(5):1472-7.
46. Okabe S, Fukuda S, Broxmeyer HE. Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell-derived factor-1alpha is associated with cell migration in a T-lymphocyte line. *Experimental hematology.* 2002;30(7):761-6.
47. Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol.* 2009;10(5):531-9.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
49. Ritter AT, Angus KL, Griffiths GM. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunol Rev.* 2013;256(1):107-17.
50. Lin P, Lin Y, Lennon DP, Correa D, Schluchter M, Caplan AI. Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem cells translational medicine.* 2012;1(12):886-97.

51. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014;343(6166):84-7.
52. Allingham JS, Smith R, Rayment I. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(4):378-9.
53. Stritt S, Nurden P, Favier R, Favier M, Ferioli S, Gotru SK, et al. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg(2+) homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nat Commun*. 2016;7:11097.
54. Sjoblom B, Salmazo A, Djinojic-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(17):2688-701.
55. van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1538(2-3):99-117.
56. Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, et al. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol*. 2001;3(12):1060-8.
57. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):138-45.
58. Kim J, Shapiro MJ, Bamidele AO, Gurel P, Thapa P, Higgs HN, et al. Coactosin-like 1 antagonizes cofilin to promote lamellipodial protrusion at the immune synapse. *PLoS One*. 2014;9(1):e85090.
59. Flynn KC, Hellal F, Neukirchen D, Jacob S, Tahirovic S, Dupraz S, et al. ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron*. 2012;76(6):1091-107.
60. Poukkula M, Kremneva E, Serlachius M, Lappalainen P. Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton*. 2011;68(9):471-90.
61. Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell*. 1998;9(8):1951-9.
62. Hawkins M, Pope B, Maciver SK, Weeds AG. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry*. 1993;32(38):9985-93.

63. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, et al. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 1997;136(6):1307-22.
64. Nishida E, Maekawa S, Sakai H. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry.* 1984;23(22):5307-13.
65. Chen G, Hou Z, Gulbranson DR, Thomson JA. Actin-myosin contractility is responsible for the reduced viability of dissociated human embryonic stem cells. *Cell stem cell.* 2010;7(2):240-8.
66. Shoham N, Girshovitz P, Katzengold R, Shaked NT, Benayahu D, Gefen A. Adipocyte stiffness increases with accumulation of lipid droplets. *Biophys J.* 2014;106(6):1421-31.
67. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-35.
68. Martin-Cofreces NB, Robles-Valero J, Cabrero JR, Mittelbrunn M, Gordon-Alonso M, Sung CH, et al. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol.* 2008;182(5):951-62.
69. Kupfer A, Dennert G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol.* 1984;133(5):2762-6.
70. Griffiths PD. Asymmetric immunology. *Reviews in medical virology.* 2007;17(4):219-21.
71. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol.* 2014;28C:3-13.
72. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene.* 2004;23(48):7990-8000.
73. Billadeau DD. T cell activation at the immunological synapse: vesicles emerge for LATer signaling. *Sci Signal.* 2010;3(121):pe16.
74. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(10):713-26.
75. Padhan K, Varma R. Immunological synapse: a multi-protein signalling cellular apparatus for controlling gene expression. *Immunology.* 2010;129(3):322-8.
76. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.

77. Grumont R, Lock P, Mollinari M, Shannon FM, Moore A, Gerondakis S. The mitogen-induced increase in T cell size involves PKC and NFAT activation of Rel/NF-kappaB-dependent c-myc expression. *Immunity*. 2004;21(1):19-30.
78. Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO. Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science*. 1999;286(5440):790-3.
79. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
80. Cebrian M, Yague E, Rincon M, Lopez-Botet M, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med*. 1988;168(5):1621-37.
81. Trybus KM. Assembly of cytoplasmic and smooth muscle myosins. *Curr Opin Cell Biol*. 1991;3(1):105-11.
82. Lymn RW, Taylor EW. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*. 1971;10(25):4617-24.
83. Fung MM, Rohwer F, McGuire KL. IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cell Signal*. 2003;15(6):625-36.
84. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 1995;81(7):1159-70.
85. Aranjuez G, Bartscher A, Sawant K, Majumder P, McDonald JA. Dynamic myosin activation promotes collective morphology and migration by locally balancing oppositional forces from surrounding tissue. *Mol Biol Cell*. 2016;27(12):1898-910.
86. Metkar SS, Wang B, Catalan E, Anderluh G, Gilbert RJ, Pardo J, et al. Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. *PLoS One*. 2011;6(9):e24286.
87. Lasserre R, Cuche C, Blecher-Gonen R, Libman E, Biquand E, Danckaert A, et al. Release of serine/threonine-phosphorylated adaptors from signaling microclusters down-regulates T cell activation. *J Cell Biol*. 2011;195(5):839-53.
88. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 2006;25(1):117-27.

89. Bertling E, Englund J, Minkeviciene R, Koskinen M, Segerstrale M, Castren E, et al. Actin Tyrosine-53-Phosphorylation in Neuronal Maturation and Synaptic Plasticity. *J Neurosci*. 2016;36(19):5299-313.
90. Holmes KC. Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. In: Coluccio LM, editor. Watertown: Springer; 2007. p. 35-54.
91. Ikebe M. Regulation of the function of mammalian myosin and its conformational change. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(1):157-64.
92. Cremo CR, Hartshorne DJ. Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. In: Coluccio LM, editor. Watertown: Springer; 2007. p. 171-222.
93. Spudich JA. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(5):387-92.
94. Imai F, Ladle DR, Leslie JR, Duan X, Rizvi TA, Ciralo GM, et al. Synapse Formation in Monosynaptic Sensory-Motor Connections Is Regulated by Presynaptic Rho GTPase Cdc42. *J Neurosci*. 2016;36(21):5724-35.
95. Rochlin MW, Itoh K, Adelstein RS, Bridgman PC. Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J Cell Sci*. 1995;108 (Pt 12):3661-70.
96. Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore L, Choi CK, Horwitz AF. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol*. 2007;176(5):573-80.
97. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
98. Sosale NG, Rouhiparkouhi T, Bradshaw AM, Dimova R, Lipowsky R, Discher DE. Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood*. 2015;125(3):542-52.
99. Auinger S, Small JV. Correlated light and electron microscopy of the cytoskeleton. *Methods Cell Biol*. 2008;88:257-72.
100. Dustin ML. Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(5):529-33.
101. Adelstein RS, Pollard TD, Kuehl WM. Isolation and characterization of myosin and two myosin fragments from human blood platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(11):2703-7.
102. Seri M, Savino M, Bordo D, Cusano R, Rocca B, Meloni I, et al. Epstein syndrome: another renal disorder with mutations in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene. *Human genetics*. 2002;110(2):182-6.

103. Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 1969;164(3886):1356-65.
104. Heissler SM, Manstein DJ. Comparative kinetic and functional characterization of the motor domains of human nonmuscle myosin-2C isoforms. *J Biol Chem*. 2011;286(24):21191-202.
105. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41263-6.
106. Cai Y, Rossier O, Gauthier NC, Biais N, Fardin MA, Zhang X, et al. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 3):413-23.
107. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 23):3923-7.
108. Szent-Gyorgyi AG. The early history of the biochemistry of muscle contraction. *The Journal of general physiology*. 2004;123(6):631-41.
109. Jacobelli J, Estin Matthews M, Chen S, Krummel MF. Activated T cell trans-endothelial migration relies on myosin-IIA contractility for squeezing the cell nucleus through endothelial cell barriers. *PLoS One*. 2013;8(9):e75151.
110. Jacobelli J, Friedman RS, Conti MA, Lennon-Dumenil AM, Piel M, Sorensen CM, et al. Confinement-optimized three-dimensional T cell amoeboid motility is modulated via myosin IIA-regulated adhesions. *Nat Immunol*. 2010;11(10):953-61.
111. Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB, Davis MM, Krummel MF. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol*. 2004;5(5):531-8.
112. Tullio AN, Accili D, Ferrans VJ, Yu ZX, Takeda K, Grinberg A, et al. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12407-12.
113. Buckley CD, Tan J, Anderson KL, Hanein D, Volkman N, Weis WI, et al. Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*. 2014;346(6209):1254211.
114. Lo CM, Buxton DB, Chua GC, Dembo M, Adelstein RS, Wang YL. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):982-9.
115. Vicente-Manzanares M, Koach MA, Whitmore L, Lamers ML, Horwitz AF. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol*. 2008;183(3):543-54.

116. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin light chain mono- and di-phosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;402(3):537-42.
117. Raab M, Swift J, Dingal PC, Shah P, Shin JW, Discher DE. Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *J Cell Biol*. 2012;199(4):669-83.
118. Hodges JL, Newell-Litwa K, Asmussen H, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PLoS One*. 2011;6(8):e24149.
119. Benham-Pyle BW, Pruitt BL, Nelson WJ. Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and beta-catenin activation to drive cell cycle entry. *Science*. 2015;348(6238):1024-7.
120. Sellers JR, Pato MD, Adelstein RS. Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J Biol Chem*. 1981;256(24):13137-42.
121. Adelstein RS, Conti MA. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature*. 1975;256(5518):597-8.
122. Umemoto S, Bengur AR, Sellers JR. Effect of multiple phosphorylations of smooth muscle and cytoplasmic myosins on movement in an in vitro motility assay. *J Biol Chem*. 1989;264(3):1431-6.
123. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-9.
124. Ricketson D, Johnston CA, Prehoda KE. Multiple tail domain interactions stabilize nonmuscle myosin II bipolar filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(49):20964-9.
125. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):130-40.
126. Turbedsky K, Pollard TD, Bresnick AR. A subset of protein kinase C phosphorylation sites on the myosin II regulatory light chain inhibits phosphorylation by myosin light chain kinase. *Biochemistry*. 1997;36(8):2063-7.
127. Grant JW, Taubman MB, Church SL, Johnson RL, Nadal-Ginard B. Mammalian nonsarcomeric myosin regulatory light chains are encoded by two differentially regulated and linked genes. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1127-35.
128. Dahan I, Yearim A, Touboul Y, Ravid S. The tumor suppressor Lgl1 regulates NMII-A cellular distribution and focal adhesion morphology to optimize cell migration. *Mol Biol Cell*. 2012;23(4):591-601.

129. Niedergang F, Hemar A, Hewitt CR, Owen MJ, Dautry-Varsat A, Alcover A. The *Staphylococcus aureus* enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J Biol Chem*. 1995;270(21):12839-45.
130. Kolega J. Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(3):1020-5.
131. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-4.
132. Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, et al. Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. *Blood*. 1999;93(10):3408-17.
133. Collste L, Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless TK, Whitmore WF, Jr., Melamed MR. Identification of polymorphonuclear leukocytes in cytologic samples for flow cytometry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1979;27(1):390-3.
134. Nowell PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*. 1960;20:462-6.
135. Vyth-Dreese FA, de Vries JE. Enhanced expression of human T-cell leukemia/lymphoma virus in neoplastic T cells induced to proliferate by phorbol ester and interleukin-2. *Int J Cancer*. 1983;32(1):53-9.
136. Valencic E, Piscianz E, Tommasini A, Granzotto M. T cells stimulated in vitro have a suppressive function but do not contain only regulatory T cells. *Clinical and experimental immunology*. 2007;150(3):561-6.
137. Dooks H, Wolslegel K, Lin P, Abbas AK. Interleukin-2 enhances CD4+ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *J Exp Med*. 2007;204(3):547-57.
138. Le K, Li CC, Ye G, Moss J, Vaughan M. Arf guanine nucleotide-exchange factors BIG1 and BIG2 regulate nonmuscle myosin IIA activity by anchoring myosin phosphatase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(34):E3162-70.
139. Vicente-Manzanares M, Rey M, Jones DR, Sancho D, Mellado M, Rodriguez-Frade JM, et al. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol*. 1999;163(7):4001-12.

140. Rey M, Vicente-Manzanares M, Viedma F, Yanez-Mo M, Urzainqui A, Barreiro O, et al. Cutting edge: association of the motor protein nonmuscle myosin heavy chain-IIA with the C terminus of the chemokine receptor CXCR4 in T lymphocytes. *J Immunol.* 2002;169(10):5410-4.
141. Vicente-Manzanares M, Sancho D, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F. The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Int Rev Cytol.* 2002;216:233-89.
142. del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Nieto M, Sanchez-Madrid F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol.* 1995;131(2):495-508.
143. Thomas DG, Yenepalli A, Denais CM, Rape A, Beach JR, Wang YL, et al. Non-muscle myosin IIB is critical for nuclear translocation during 3D invasion. *J Cell Biol.* 2015;210(4):583-94.
144. Hammer JA, 3rd, Burkhardt JK. Controversy and consensus regarding myosin II function at the immunological synapse. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(3):300-6.
145. Ballestrem C, Erez N, Kirchner J, Kam Z, Bershadsky A, Geiger B. Molecular mapping of tyrosine-phosphorylated proteins in focal adhesions using fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 5):866-75.
146. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004;6(2):154-61.
147. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol.* 2008;10(9):1039-50.
148. Finck H. On the discovery of actin. *Science.* 1968;160(3825):332.
149. Giannoni F, Barnett J, Bi K, Samodal R, Lanza P, Marchese P, et al. Clustering of T cell ligands on artificial APC membranes influences T cell activation and protein kinase C theta translocation to the T cell plasma membrane. *J Immunol.* 2005;174(6):3204-11.
150. Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:435-66.
151. Mommaerts WF. Who discovered actin? *Bioessays.* 1992;14(1):57-9.

152. Vicente-Manzanares M, Newell-Litwa K, Bachir AI, Whitmore LA, Horwitz AR. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *J Cell Biol.* 2011;193(2):381-96.
153. Wang F, Kovacs M, Hu A, Limouze J, Harvey EV, Sellers JR. Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27439-48.
154. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):770-6.
155. Bao J, Jana SS, Adelstein RS. Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19594-9.
156. Ou G, Stuurman N, D'Ambrosio M, Vale RD. Polarized myosin produces unequal-size daughters during asymmetric cell division. *Science.* 2010;330(6004):677-80.
157. Shin JW, Buxboim A, Spinler KR, Swift J, Christian DA, Hunter CA, et al. Contractile forces sustain and polarize hematopoiesis from stem and progenitor cells. *Cell stem cell.* 2014;14(1):81-93.
158. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, Legrand C, Pan J, Rameau P, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun.* 2012;3:717.
159. Ubukawa K, Guo YM, Takahashi M, Hirokawa M, Michishita Y, Nara M, et al. Enucleation of human erythroblasts involves non-muscle myosin IIB. *Blood.* 2012;119(4):1036-44.
160. Kolega J. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 15):2085-95.
161. Arsenio J, Metz PJ, Chang JT. Asymmetric Cell Division in T Lymphocyte Fate Diversification. *Trends in immunology.* 2015;36(11):670-83.
162. Ma X, Bao J, Adelstein RS. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):2305-12.
163. Kunishima S, Saito H. Advances in the understanding of MYH9 disorders. *Current opinion in hematology.* 2010;17(5):405-10.

164. Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E, et al. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(3):203-15.
165. McIntosh JR, Molodtsov MI, Ataullakhanov FI. Biophysics of mitosis. *Quarterly reviews of biophysics*. 2012;45(2):147-207.
166. Weiss EL. Mitotic exit and separation of mother and daughter cells. *Genetics*. 2012;192(4):1165-202.
167. Wang W, Guo J, Yu D, Vorster PJ, Chen W, Wu Y. A dichotomy in cortical actin and chemotactic actin activity between human memory and naive T cells contributes to their differential susceptibility to HIV-1 infection. *J Biol Chem*. 2012;287(42):35455-69.
168. Permanyer M, Pauls E, Badia R, Este JA, Ballana E. The cortical actin determines different susceptibility of naive and memory CD4+ T cells to HIV-1 cell-to-cell transmission and infection. *PLoS One*. 2013;8(11):e79221.
169. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 1992;360(6401):264-5.
170. Rogers PR, Dubey C, Swain SL. Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol*. 2000;164(5):2338-46.
171. Stout RD, Suttles J. T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol*. 1992;141(2):433-43.
172. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*. 2008;453(7191):51-5.
173. Sanchez-Madrid F, Serrador JM. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):353-9.
174. Caswell PT, Norman JC. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic*. 2006;7(1):14-21.
175. Alexandrova AY, Arnold K, Schaub S, Vasiliev JM, Meister JJ, Bershadsky AD, et al. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE*. 2008;3(9):e3234.
176. Huang J, Meyer C, Zhu C. T cell antigen recognition at the cell membrane. *Molecular immunology*. 2012;52(3-4):155-64.

177. Dustin ML. Modular design of immunological synapses and kinapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(1):a002873.
178. Nordenfelt P, Elliott HL, Springer TA. Coordinated integrin activation by actin-dependent force during T-cell migration. *Nat Commun.* 2016;7:13119.
179. Boettiger D. Mechanical control of integrin-mediated adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(5):592-9.
180. Vardhana S, Choudhuri K, Varma R, Dustin ML. Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity.* 2010;32(4):531-40.
181. Mossman KD, Campi G, Groves JT, Dustin ML. Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science.* 2005;310(5751):1191-3.
182. Campi G, Varma R, Dustin ML. Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med.* 2005;202(8):1031-6.